

DISS. ETH NO. 25392

***Analysis of local field potentials in organotypic  
hippocampal cultures of NMDA receptor subunit  
knockout mice***

A thesis submitted to attain the degree of  
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH  
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by  
*Ben van Lier*

*MSc, Maastricht University*  
born on 23.11.1985

citizen of  
*The Netherlands*

accepted on the recommendation of

*Prof. Dr. Andreas Hierlemann*  
*Dr. Frédéric Knoflach*  
*Prof. Dr. Benjamin Hall*

2018

## **Abstract**

Brain disorders are among the most life-altering and deadliest affections. Not only do they cause grave personal tragedy, the cost to society is also immense. An extensive study to the economic cost of brain disorders in the European Union estimated the total cost to be 798 billion Euros in 2010 (Gustavsson et al., 2011). The huge costs of brain disorders pose a major challenge for European society. Moreover, the prevalence and costs are expected to increase in the future due to increasing life expectancy. The discovery and development of new drugs is difficult, and therefore, slow and expensive. On average, it costs 1.8 billion Dollar and 13.5 years for a new molecular entity to reach the market. It is essential to be able to better predict the efficacy of a molecule in humans while it is still in a preclinical stage. For this, novel methods are required that improve translation of animal research to humans.

Schizophrenia is a severe, chronic brain disorder that affects a person's thoughts, feelings and behavior affecting more than 21 million people worldwide. The first symptoms usually appear during adolescence, between the ages of 16 and 30. The symptoms are variable and can be categorized into three types: positive, negative and cognitive. Although it is highly heritable (Cardno & Gottesman, 2000), there is no clear cause of schizophrenia. The pathophysiology of schizophrenia is complex and not well understood. Several hypotheses exist that attempt to explain the observations.

One of the hypotheses is the NMDA receptor (NMDAR) hypofunction theory. This theory is based on the observation that NMDAR antagonists, like PCP and ketamine, induce schizophrenia-like positive, negative and cognitive symptoms in healthy subjects (Olney, Newcomer, & Farber, 1999) and working memory deficits in rats (David A. Lewis & Gonzalez-Burgos, 2006). Most genes associated with an elevated risk for schizophrenia are related to NMDA receptors or glutamate-related intracellular signaling pathways (Harrison & Owen, 2003).

Electroencephalography (EEG) measurements in humans show that working memory is associated with gamma oscillations (30-100 Hz) (Howard et al., 2003). These

gamma oscillations are altered in schizophrenic patients (Sun et al., 2011; Uhlhaas, Roux, Rodriguez, Rotarska-Jagiela, & Singer, 2010). Parvalbumin (PV)-containing GABA interneurons seem to play an important role in these gamma oscillations. The GABA interneurons seem to be a prime target for NMDAR hypofunction because they are more sensitive to NMDAR antagonists than pyramidal neurons (David A. Lewis & Gonzalez-Burgos, 2006). GABA-ergic circuits are highly immature at birth and GABA-ergic inhibition develops in a protracted postnatal period (Nakazawa et al., 2012).

The purpose of the research in this thesis was to establish a method for better translation of animal research to humans in the field of neurodevelopmental disorders. Specifically, the aim was to mimic the altered brain activity, as seen in schizophrenic patients, in mice. A relatively well understood circuit like hippocampus served as a starting point to study pathophysiology on (micro)circuit level. To include the neurodevelopmental aspect, organotypic hippocampal cultures were used. The activity in these cultures was recorded over multiple time points on microelectrode arrays.

There are four different types of GluN2 subunits (A-D). These have different functional properties and are expressed heterogeneously regionally and during development (for review see Cull-Candy, Brickley, and Farrant (2001)). GluN2B and GluN2D expression is already seen during embryonic stages, whereas GluN2A and GluN2C are first seen postnatal. During postnatal development, the expression of GluN2B diminishes while GluN2A rises. Both GluN2B and GluN2A are prominent in hippocampus and cortex (Monyer, Burnashev, Laurie, Sakmann, & Seeburg, 1994).

First, we investigated GluN2A KO mice. To test the validity of the GluN2A KO mice as a model for NMDAR hypofunction, we performed long-term potentiation (LTP) recordings. Compared to wild-type, acute slices of adult GluN2A KO mice showed a diminished early phase LTP. We next sought to find evidence for neurodevelopmental effects of GluN2A KO using organotypic cultures. Immunohistochemistry was used to detect expression of PV on days *in vitro* (DIV) 2, 7, 14 and 25. Microelectrode array technology was used to record carbachol-induced

oscillatory activity of the cultures on DIV 7, 13 and 26. Parvalbumin expression and gamma oscillation occurrence increased strongly over the first 2 weeks *in vitro*. The expression and occurrence effects subsequently plateaued over the third and fourth week *in vitro*. The cultures of GluN2A KO mice showed a similar curve of parvalbumin expression but at a lower level compared to wild-type.

In a second paper, we used mice with GluN2B KO in pyramidal cells. Mice with full KO of GluN2B are not viable; they die on P0-1 due to an impaired suckling response. The organotypic hippocampal cultures were recorded at DIV 7, 14, 35 and 63 on microelectrode arrays and activity was induced by the cholinergic agonist carbachol. We found that carbachol can induce different types of activity in organotypic hippocampal cultures of wild-type and GluN2B KO mice up to DIV 63. We used a method to be able to compare the different conditions by selecting a representative channel on the MEA and split the time series into sections of similar activity. Features to be analyzed were extracted from these sections. A method to detect individual events within each section was then used, which enabled the extraction of analytical features from these events for further analysis. Then it was determined which features of the data set were actually important for differentiating genotypes and/or DIV. To do this, we used a machine learning algorithm called random forest. Additionally, quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was performed to measure parvalbumin, GluN2A and GluN2B gene expression over time in the organotypic cultures.

The main finding was that GluN2B KO in pyramidal cells led to abnormally high amplitude activity in the organotypic hippocampal cultures. This effect persisted from DIV 7, 14, 35 to 63. We argue that these findings may constitute sharp-wave activity (also known as giant depolarizing potentials). Because this type of activity is normally only seen neonatal, we hypothesize that the GluN2B KO cultures may have remained in an early phase of development.

The overall conclusion is that organotypic cultures can and should be exploited more in (neurodevelopmental) disease modeling, and that MEAs are a well-suited tool to study the corresponding electrical activity patterns. The electrophysiological phenotypes of GluN2A KO (early phase of LTP impairment) and GluN2B KO (high

amplitude events) shown in chapter 2 and 3 are interesting results in light of the NMDAR hypofunction theory.

## Zusammenfassung

Gehirnerkrankungen gehören zu den größten lebensverändernden und tödlichsten Erkrankungen. Sie verursachen nicht nur schwere persönliche Tragödien, sondern sie sind auch verantwortlich für hohe Kosten zu Lasten der Gesellschaft. Eine umfangreiche Studie zu den wirtschaftlichen Kosten von Hirnerkrankungen in der Europäischen Union schätzt die Gesamtkosten im Jahr 2010 auf 798 Milliarden Euro (Gustavsson et al., 2011). Die enormen Kosten von Hirnerkrankungen stellen eine große Herausforderung für die europäische Gesellschaft dar. Darüber hinaus wird erwartet, dass die Prävalenz und die Kosten in Zukunft aufgrund der steigenden Lebenserwartung steigen werden. Die Entdeckung und Entwicklung neuer Medikamente ist schwierig und daher langsam und teuer. Im Durchschnitt kostet es 1,8 Milliarden Dollar und 13,5 Jahre, bis eine neue molekulare Einheit den Markt erreicht. Es ist wichtig, die Wirksamkeit eines Moleküls beim Menschen noch im präklinischen Stadium besser vorhersagen zu können. Dazu werden neuartige Methoden benötigt, die die Übertragung von der Tierforschung auf den Menschen verbessern.

Schizophrenie ist eine schwere, chronische Gehirnerkrankung, die die Gedanken, Gefühle und Verhaltensweisen von mehr als 21 Millionen Menschen weltweit betrifft. Die ersten Symptome treten normalerweise in der Adoleszenz zwischen 16 und 30 Jahren auf. Die Symptome sind variabel und können in drei Typen eingeteilt werden: positiv, negativ und kognitiv. Obwohl es stark vererbbar ist, gibt es keine eindeutige Ursache für Schizophrenie. Die Pathophysiologie der Schizophrenie ist komplex und nicht gut verstanden. Es gibt mehrere Hypothesen, die vorhandenen Beobachtungen im Bereich der Schizophrenie zu erklären.

Eine der Hypothesen ist die Hypofunktionstheorie des NMDA-Rezeptors (NMDAR). Diese Theorie basiert auf der Beobachtung, dass NMDAR-Antagonisten, wie PCP und Ketamin, bei gesunden Probanden Symptome ähnlich zum Krankheitsbild von Schizophrenie auslösen (Olney et al., 1999) sowie für Defizite im Arbeitsgedächtnis bei Ratten verantwortlich sind (David A. Lewis & Gonzalez-Burgos, 2006). Die meisten Gene, die mit einem erhöhten Risiko für Schizophrenie assoziiert sind,

stehen in Zusammenhang mit NMDA-Rezeptoren oder Glutamat-bezogenen intrazellulären Signalwegen (Harrison & Owen, 2003).

Elektroenzephalographie Messungen (EEG) am Menschen zeigen, dass das Arbeitsgedächtnis mit Gamma-Oszillationen (30-100 Hz) verbunden ist (Howard et al., 2003). Diese Gamma-Oszillationen sind bei schizophrenen Patienten verändert (Sun et al., 2011; Uhlhaas et al., 2010). Parvalbumin-haltige (PV) GABA-Interneuronen scheinen bei diesen Gamma-Oszillationen eine wichtige Rolle zu spielen. Die GABA-Interneuronen scheinen ein Hauptziel für NMDAR-Hypofunktion zu sein, da sie empfindlicher auf NMDAR-Antagonisten reagieren als pyramidale Neuronen (David A. Lewis & Gonzalez-Burgos, 2006). GABAerge Kreisläufe sind bei der Geburt sehr unterentwickelt und die GABAergische Hemmung entwickelt sich in einer protrahierten postnatalen Periode (Nakazawa et al., 2012).

Der Zweck der Forschung dieser Arbeit war es, im Bereich der neurologischen Entwicklungsstörungen eine Methode für eine bessere Übersetzung von der Tierforschung auf den Menschen zu etablieren. Spezifisches Ziel war, die veränderte Hirnaktivität von schizophrenen Patienten bei Mäusen nachzuahmen. Ein relativ gut verstandener Kreislauf wie der Hippocampus diente als Ausgangspunkt, um die Pathophysiologie auf (Mikro-) Kreislauf-Ebene zu untersuchen. Um den neuronalen Entwicklungsaspekt zu berücksichtigen, wurden organotypische hippocampale Kulturen verwendet. Die Aktivität in diesen Kulturen wurde über mehrere Zeitpunkte auf Mikroelektroden-Arrays aufgezeichnet.

Es gibt vier verschiedene Arten von GluN2-Untereinheiten (A-D). Diese haben unterschiedliche funktionelle Eigenschaften und werden regional und während der Entwicklung heterogen exprimiert (zur Übersicht siehe Cull-Candy et al. (2001)). Die GluN2B- und GluN2D-Expression wird bereits während der Embryonalentwicklung beobachtet, während GluN2A und GluN2C erst postnatal beobachtet werden. Während der postnatalen Entwicklung nimmt die Expression von GluN2B ab, während GluN2A ansteigt. Sowohl GluN2B als auch GluN2A sind prominent in Hippocampus und Cortex (Monyer et al., 1994).

Zuerst untersuchten wir GluN2A KO Mäuse. Um die Validität der GluN2A-KO-Mäuse als Modell für eine NMDAR-Hypofunktion zu testen, führten wir Langzeit-Potenzierungs (LTP) Aufzeichnungen durch. Im Vergleich zum Wildtyp zeigten adulte GluN2A-KO-Mäuse eine verminderte frühe Phase LTP. Als nächstes versuchten wir, Hinweise auf neurodevelopmentale Effekte von GluN2A KO mit organotypischen Kulturen zu finden. Immunhistochemie wurde verwendet, um die Expression von PV an Tagen in vitro (DIV) 2, 7, 14 und 25 zu detektieren. Die Mikroelektroden-Array-Technologie wurde verwendet, um die Carbachol-induzierte oszillatorische Aktivität der Kulturen an DIV 7, 13 und 26 aufzuzeichnen. Die Parvalbumin-Expression und das Auftreten der Gamma-Oszillationen nahmen in den ersten 2 Wochen in vitro stark zu. Die Effekte dieser Expression und des Auftretens der Gamma-Oszillationen blieben in der dritten und vierten Woche in vitro konstant. Die Kulturen von GluN2A-KO-Mäusen zeigten eine ähnliche Kurve der Parvalbumin-Expression, jedoch auf einem niedrigeren Niveau im Vergleich zum Wildtyp.

In einer zweiten Arbeit haben wir Mäuse mit GluN2B KO in Pyramidenzellen verwendet. Mäuse mit totalem KO von GluN2B sind nicht lebensfähig; Sie sterben auf P0-1 aufgrund einer beeinträchtigten Saugreaktion. Die organotypischen hippocampalen Kulturen wurden an DIV 7, 14, 35 und 63 auf Mikroelektroden-Anordnungen aufgezeichnet und die Aktivität wurde durch den cholinergen Agonisten Carbachol induziert. Wir fanden heraus, dass Carbachol in organotypischen hippocampalen Kulturen von Wildtyp- und GluN2B-KO-Mäusen bis zu DIV 63 verschiedene Aktivitätstypen induzieren kann. Wir verglichen diese verschiedenen Konditionen durch die Anwendung eines repräsentativen Kanals auf der MEA und teilten die Zeitreihen in Abschnitte mit ähnlicher Aktivität ein. Zu analysierende Merkmale wurden aus diesen Abschnitten extrahiert. Es wurde anschließend eine Methode zur Erkennung einzelner Ereignisse in jedem Abschnitt verwendet, um analytische Merkmale zu extrahieren. Dann wurde bestimmt, welche Merkmale des Datensatzes tatsächlich wichtig für die Differenzierung von Genotypen und / oder DIV waren. Um dies zu erreichen, verwendeten wir einen maschinellen Lernalgorithmus namens Random Forest. Zusätzlich wurde eine quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) durchgeführt, um die Parvalbumin-, GluN2A- und GluN2B-Genexpression über die Zeit in den organotypischen Kulturen zu messen.



Das Hauptergebnis war, dass GluN2B KO in Pyramidenzellen zu einer ungewöhnlich hohen Amplitudenaktivität in den organotypischen Hippocampuskulturen führte. Dieser Effekt blieb von DIV 7, 14, 35 bis 63 bestehen. Wir argumentieren, dass diese Befunde eine Sharp-Wave-Aktivität darstellen können (auch bekannt als Giant Depolarizing Potentiale). Da diese Art von Aktivität normalerweise nur neonatal gesehen wird, nehmen wir an, dass die GluN2B KO-Kulturen möglicherweise in einer frühen Phase der Entwicklung verblieben sind.

Die allgemeine Schlussfolgerung ist, dass organotypische Kulturen mehr und mehr bei der Modellierung von (Neuroentwicklungs)-Störungen genutzt werden können und sollen. Zudem kann festgestellt werden, dass MEAs dafür ein gut geeignetes Werkzeug sind, um die entsprechenden elektrischen Aktivitätsmuster zu untersuchen. Die elektrophysiologischen Phänotypen von GluN2A KO (frühe Phase LTP-Beeinträchtigung) und GluN2B KO (hohe Amplitudenereignisse), die in Kapitel 2 und 3 gezeigt sind, sind interessante Ergebnisse im Lichte der NMDAR-Hypofunktionstheorie.