

DISS. ETH NO. 22437

Methods for Synaptic Connectivity Mapping, Neuronal Stimulation and Spike Sorting Using High-density Microelectrode Arrays and Patch Clamp Recordings

A thesis submitted to attain the degree of DOCTOR OF SCIENCES of ETH
ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

David Jäckel

MSc. ETH in Electrical Engineering, Switzerland

born on 04.11.1980

Citizen of Geroldswil ZH, Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Andreas Hierlemann

Prof. Dr. Ulrich Egert

Dr. Urs Frey

2014

Abstract

Recent advances in microelectronics and microfabrication technology have allowed for developing novel high-density microelectrode arrays, incorporating thousands of densely-arrayed microelectrodes for measuring and stimulating neuronal activity. The high spatiotemporal resolution of high-density microelectrode array (HD-MEA) technology offers possibilities to conduct novel experiments, which are not possible by using traditional techniques. At the same time, the vast amount of data, recorded by hundreds to thousands of electrodes, also poses new challenges to performing signal processing and data analysis. This thesis presents the development and evaluation of spike sorting techniques, as well as experiments on targeted stimulation and mapping postsynaptic signals by combining the HD-MEA technology with the traditional patch clamp technique.

For observed signals that constitute a linear mixture of a set of source signals, independent component analysis (ICA) can be used to blindly deconvolve the data and to extract the individual source signals. ICA offers great potential to alleviate the problem of spike sorting in HD-MEA recordings, as it represents an unsupervised method to separate the neuronal sources. The characteristics of extracellular signals of retinal ganglion cells (RGCs), recorded at high spatiotemporal resolution by HD-MEAs, were analyzed. This analysis revealed that the recorded data cannot be modeled as a purely linear mixture. Artificial realistic HD-MEA recordings of RGC activity were simulated for different neuronal densities and used to evaluate the performance of ICA as a stand-alone tool for spike sorting. In order to overcome the limitations arising from the nonlinearity of the sources, an iterative algorithm combining PCA and clustering techniques with ICA was developed. The spike sorting performance of the unsupervised ICA-based algorithm was found to strongly depend on cell density and spike amplitudes.

A system combining an upright microscope, the HD-MEA, and a conventional patch clamp setup was built. Image alignment software was developed to automatically detect the electrode identities on acquired images. Hardware and software components of the HD-MEA system were modified in order to route the signals of the patch clamp

amplifiers through the HD-MEA recording and acquisition system, which facilitated the experiments. The system was complemented with software tools, which were developed to combine optical, extracellular and intracellular data, and which allowed for performing more complex experiments.

Simultaneous intra- and extracellular recordings of embryonic rat neurons, cultured on the HD-MEA chips, were performed and combined with optical staining techniques. These combined measurements allowed for mapping the extracellular signals to the neuronal morphology, as well as to reveal the relative timings between the extracellular and intracellular action potentials (APs).

The experimental set-up was also used to record and to map individual inhibitory and excitatory postsynaptic potentials (PSPs). Spontaneous extracellular activity from multiple neurons was recorded with the HD-MEA, while the membrane potential of an individual patched cell was measured. Average PSPs between pre- and postsynaptic cells were obtained by spike-triggered averaging of the postsynaptic intracellular signals, based on the presynaptic spike times. Alternatively, presynaptic APs were evoked by stimulation through the HD-MEA electrodes, and the resulting PSPs were measured at the patched neuron. Stimulation pulses of different amplitudes were sequentially applied at subsets of electrodes in order to identify stimuli, which evoked individual monosynaptic PSPs. The identified stimuli could be used to evoke PSPs from multiple presynaptic neurons in arbitrary patterns, in order to study interactions between different presynaptic inputs under controlled conditions.

By using a combination of intra- and extracellular recordings and optical imaging, the effects of HD-MEA stimulation on cultured neurons were investigated. Many stimulation electrodes in different locations could be used to evoke activity of individual neurons. While the somato-dendritic neuronal compartment was identified as a region of low excitability, regions in which large extracellular neuronal signals could be recorded were comparably efficient in exciting the respective neurons through subsets of electrodes. Immunohistochemical imaging, combined with extracellular spontaneous recordings, indicated that the largest extracellular signals of cultured neurons on HD-MEAs can be recorded near the axonal initial segment (AIS), which also is an area

of high neuronal excitability. Therefore, the region of large extracellular signals is highly suitable for targeted stimulation of identified neurons.

Zusammenfassung

Die Herstellung neuartiger, hochauflösender Mikroelektrodenarrays (HD-MEAs) mit tausenden von Mikroelektroden zum Messen und Stimulieren neuronaler Aktivität wurde durch Entwicklungen in den Bereichen der Mikroelektronik und Mikrofabrikation ermöglicht. Die hohe räumliche und zeitliche Auflösung von HD-MEAs kann für neue Experimente genutzt werden, die mit konventionellen Methoden nicht durchführbar waren. Die grossen Datenmengen, welche durch gleichzeitiges Messen von Signalen hunderter bis tausender Elektroden generiert werden, erfordern allerdings auch neue Ansätze zur Signalverarbeitung und Datenanalyse. Die vorliegende Arbeit enthält Konzepte zur Entwicklung und Evaluierung von Klassifizierungsalgorithmen gemessener Aktionspotentiale. Weiterhin werden Experimente zur Stimulierbarkeit von Hirnzellen sowie zum Messen postsynaptischer Potentiale mittels einer Kombination von HD-MEAs und der Patch Clamp Technik aufgeführt.

Besteht ein Messsignal aus der linearen Mischung von Ursprungssignalen, so kann die Methode der Independent Component Analysis (ICA) dazu benutzt werden, die Signale automatisch zu entmischen und die Ursprungssignale wiederherzustellen. Könnten die gemessenen Signale der HD-MEAs mittels ICA entmischt werden, um die ursprünglichen neuronalen Signale wiederherzustellen, würde dies die Analyse bedeutend erleichtern. Die Eigenschaften der mittels HD-MEA gemessenen extrazellulären Signale von retinalen Ganglionzellen (RGC) wurden hinsichtlich ihrer Linearität analysiert, und entsprachen nur bedingt den Anforderungen der ICA Methode. Die Leistungsfähigkeit der ICA Methode zur Entmischung von gemessenen HD-MEA Signalen wurde mittels simulierter künstlicher RGC-Messdaten evaluiert. Ein iterativer Algorithmus, welcher ICA mit der Hauptkomponentenanalyse und Clustering Technik kombiniert wurde entwickelt, um die Limitierungen der ICA-Methode zu umgehen. Die Resultate der Evaluierung des automatischen Algorithmus zur Klassifizierung von Aktionspotentialen zeigen, dass dessen Leistungsfähigkeit stark von der Zelldichte sowie von den Signalamplituden abhängt.

Ein System wurde realisiert, welches ein Mikroskop mit dem HD-MEA und der Patch Clamp Technik verbindet. Mittels automatischer Zuordnung konnten die individuellen Elektroden auf Mikroskopiebildern identifiziert werden. Hardware- und Softwarekomponenten des HD-MEA Systems wurden modifiziert, um die Patch Clamp Signale direkt in das HD-MEA System einlesen zu können, was die Experimente erheblich erleichterte. Verschiedene Softwareprogramme zur Kombination optischer, intrazellulärer, sowie extrazellulärer Daten wurden entwickelt, die dann komplexere Experimente ermöglichten.

Hirnzellen von embryonalen Ratten wurden auf den HD-MEA-Chips kultiviert. Intrazelluläre und extrazelluläre Messungen wurden simultan durchgeführt und mit Mikroskopiebildern kombiniert. Diese Messungen gaben Aufschluss über die Positionen extrazellulärer Signale mit Hinsicht auf die Morphologie der Hirnzellen, sowie über das relative Timing intrazellulärer und extrazellulärer Aktionspotentiale.

Inhibitorische und exzitatorische postsynaptische Potentiale (PSPs) wurden mit dem realisierten System gemessen und zugeordnet. Während das intrazelluläre Signal einer Hirnzelle mit der Patch-Clamp-Methode gemessen wurde, wurden gleichzeitig die spontanen extrazellulären Signale von mehreren Zellen aufgezeichnet. Die durchschnittlichen PSPs wurden berechnet, indem das intrazelluläre Signal der postsynaptischen Zelle während der Aktionspotentiale der einzelnen präsynaptischen Zellen gemittelt wurde. Alternativ wurden präsynaptische Zellen elektrisch stimuliert und die dadurch ausgelösten PSPs an der postsynaptischen Zelle gemessen. An mehreren Elektroden wurde mit unterschiedlichen Amplituden stimuliert, um Stimuli zu identifizieren, die PSPs durch unterschiedliche präsynaptische Zellen auslösten. Die so identifizierten Stimuli können dazu benutzt werden, PSPs in beliebigen Mustern auszulösen, um die Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen synaptischen Signalen zu studieren.

Die Effekte elektrischer Stimulation kultivierter Hirnzellen durch das HD-MEA wurden mithilfe einer Kombination intrazellulärer, extrazellulärer und optischer Daten untersucht. Aktionspotentiale einzelner Neuronen konnten durch Stimulation an mehreren verschiedenen Elektroden ausgelöst werden. Während Hirnzellen in

der somato-dendritischen Region nur sehr beschränkt stimulierbar waren, konnten die Zellen in Regionen, in denen grosse extrazelluläre Signalamplituden gemessen wurden durch einige Elektroden vergleichbar effizient stimuliert werden. Immunohistochemische Untersuchungen ergaben, dass diese Regionen mit grossen Signalamplituden um das Initialsegment des Axons angeordnet waren. Diese Regionen mit grossen extrazellulären Amplituden sind in hohem Masse geeignet, um identifizierte Hirnzellen gezielt zu stimulieren.