



**Charakterisierung und Anwendung  
funktioneller neuronaler Netzwerke generiert  
aus murinen embryonalen Stammzellen.**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Sebastian Illes**  
aus Velbert

Düsseldorf, Oktober 2009

aus dem Institut für  
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. H.-W. Müller  
Koreferent: Prof. Dr. C. Rose

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Dezember 2009

Für meine Familie

# 1 Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>2</b>
2.1	<b>WAS SIND STAMMZELLEN?</b> .....	2
2.2	<b>ANWENDUNG PLURIPOTENTER STAMMZELLEN</b> .....	6
2.3	<b>NEURALE ENTWICKLUNG PLURIPOTENTER STAMMZELLEN <i>IN VITRO</i></b> .....	7
2.4	<b>FUNKTIONALITÄT ES ZELL-ABGELEITETER NEURONALER ZELLEN</b> .....	10
2.5	<b>EIGENSCHAFTEN VON NEURONEN <i>IN VIVO</i> UND <i>IN VITRO</i></b> .....	12
<b>3</b>	<b>ZIELSETZUNG</b> .....	<b>16</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b> .....	<b>18</b>
4.1	<b>GENERIERUNG ES ZELL-ABGELEITETER NEURALER STAMM- UND VORLÄUFERZELLEN</b> .....	18
4.2	<b>ENTWICKLUNG ES ZELL-ABGELEITETER NEURONALER NETZWERKE <i>IN VITRO</i></b> .....	22
4.2.1	<i>Ergebnisse</i> .....	22
4.2.2	<i>Diskussion</i> .....	24
4.3	<b>EIGENSCHAFTEN NEURONALER NETZWERKE IN ABHÄNGIGKEIT UNTERSCHIEDLICHER   DIFFERENZIERUNGSPROTOKOLLE FÜR ES ZELLEN</b> .....	26
4.3.1	<i>Einleitung</i> .....	26
4.3.2	<i>Ergebnisse</i> .....	26
4.3.3	<i>Diskussion</i> .....	29
4.4	<b>EINFLUSS VON LIQUOR CEREBROSPINALIS VON SCHÄDEL-HIRN-TRAUMA-PATIENTEN AUF DIE   NEURONALE NETZWERKAKTIVITÄT VON ES ZELL-ABGELEITETEN NEURONALEN NETZWERKEN</b> .....	32
4.4.1	<i>Einleitung</i> .....	32
4.4.2	<i>Ergebnisse</i> .....	33
4.4.3	<i>Diskussion</i> .....	35
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>40</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>42</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>51</b>
<b>9</b>	<b>PUBLIKATIONEN</b> .....	<b>52</b>
<b>10</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>53</b>

## 2 Einleitung

### 2.1 Was sind Stammzellen?

Im Allgemeinen sind Stammzellen durch zwei Eigenschaften definiert, erstens die Fähigkeit bei der Zellteilung mindestens eine weitere Stammzelle hervor zu bringen (*Selbsterneuerung*) und zweitens das Potential in einen anderen Zelltyp zu differenzieren (*Entwicklungspotenzialität*). Anhand des Gewebeansprungs (z.B. kardial, neural, mesenchymal etc.), des Entwicklungsalters (embryonal, fötal, adult) und insbesondere der Ausprägung der Potenzialität lassen sich unterschiedliche Stammzelltypen klassifizieren.

Die Potenzialität gibt das mögliche Entwicklungsspektrum von Zelle an. So entsteht aus totipotenten (lat. nach *totus* = ganz, vollständig) Zellen ein vollständiger Organismus aus somatischen (griech. nach *soma* = Körper) und gonosomalen<sup>1</sup> (griech. nach *gonos* = Geburt) Zellen. Diese Fähigkeit lässt sich *in vivo* ausschließlich der befruchteten Eizelle und den Blastomeren der Morula zuweisen. Aus der Morula entwickelt sich die Blastozyste. Diese besteht aus dem Trophoektoderm, aus einer mit Flüssigkeit gefüllten Höhle – dem Blastocoel – und aus den Zellen der inneren Zellmasse (Abb. 1). Nach der Implantation der Blastozyste in die Uteruswand bilden die Zellen der inneren Zellmasse die drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm aus (Abb. 1). Trotz dieser hohen Potenzialität können die Zellen der inneren Zellmasse, im Gegensatz zu einer totipotenten Zelle, nicht das Trophoektoderm ausbilden, wodurch sich aus diesen Zellen keine vollwertige Blastozyste und somit kein Organismus entwickeln kann. Daher werden die Zellen der inneren Zellmasse als pluripotente (lat. nach *plures* = viele) Zellen bezeichnet, aus denen „lediglich“ ekto-, meso- und endodermale Gewebe entstehen. Dies zeigt, dass nur die Fusion zweier verschiedengeschlechtlicher Gameten die Entstehung einer Morula und folglich einer Blastocyste ermöglicht, in der sowohl die innere Zellmasse als auch das Trophoektoderm als Voraussetzung zur Embryoentstehung vorhanden sind. Im Embryo selbst werden die Keimblattzellen und deren zellulären Derivate als multi- (lat. nach *multi* = mehr, einige), bi- (lat. nach *bi* = zwei) oder unipotente (lat. nach *unos* = ein) Zellen bezeichnet, aus denen sich letztendlich die ausdifferenzierten, somatischen oder

---

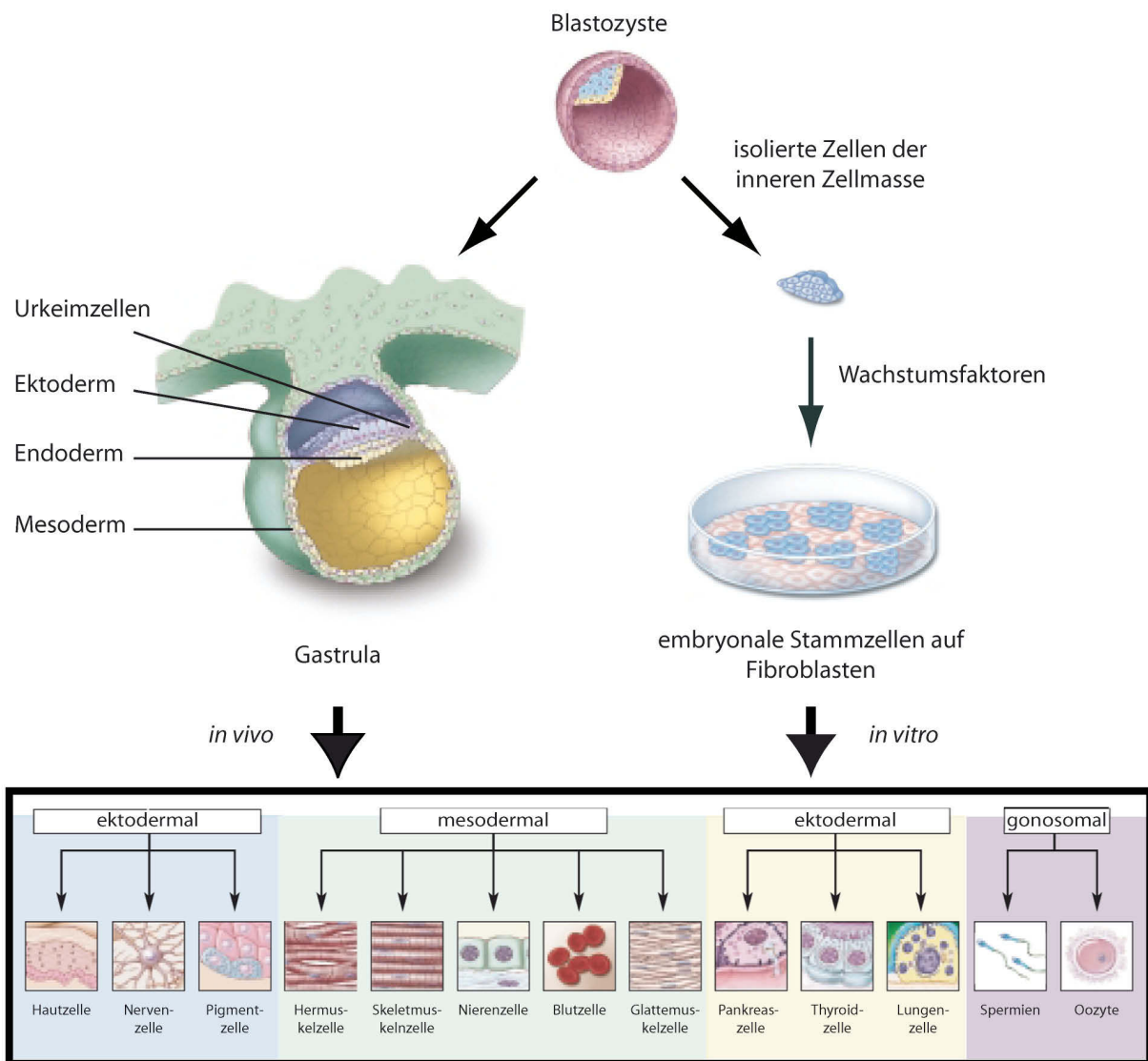
<sup>1</sup> Gonosomale Zellen sind Geschlechtszellen und weisen – im Gegensatz zu den somatischen Zellen – nur den einfachen Chromosomensatz auf und stellen somit einen haploiden Zelltyp dar.

gonosomalen Zellen entwickeln. Diese reifen Zellen sind nicht mehr zur Zellteilung fähig und müssen, nachdem sie abgestorben sind, durch neue Zellen ersetzt werden. Diese Aufgabe übernehmen fötale bzw. adulte multipotente Stammzellen, welche in verschiedenen Organen (z.B. Knochen, Cornea, Retina, Leber, gastrointestinaler Trakt, Haut, Blut) innerhalb sogenannter Stammzellnischen verbleiben und lebenslang für die Bildung organspezifischer Zellen zuständig sind. Innerhalb eines Organs gibt es eine Vielzahl terminal differenzierter Zellen, wie z.B. Nervenzellen oder Herzmuskelzellen, die zur Aufrechterhaltung der Organfunktion, ein Leben lang erhalten bleiben sollten und somit nicht permanent, wie z.B. Darm- oder Hautepithelzellen, durch Zellen aus endogenen Stammzellen ersetzt werden. Jedoch sind beispielsweise bei Degenerationserkrankungen oftmals terminal differenzierte Zellen, die nicht regeneriert werden können, betroffen, was zu Funktionseinbußen führt. Ein Ziel der Stammzellforschung ist, Zellen, welche durch Erkrankungen oder Traumata zugrunde gehen, spezifisch zu ersetzen. Hierzu muss das Entwicklungspotenzial von Stammzellen so exakt wie möglich untersucht werden, um diese in die benötigten Zellen zu differenzieren. Zuerst werden Stammzellen aus den jeweiligen Organischen isoliert und in Kultur gebracht, um dann durch verschiedene Botenstoffe im Zellkulturmedium in die gewünschte Zellart dirigiert zu werden (Reynolds and Weiss, 1992; Smith et al., 2007). Dies ermöglicht die Differenzierung funktioneller und spezialisierter Zellen. Dabei zeigte sich, dass Stammzellen, isoliert aus dem adulten Organismus, ein eher begrenztes Entwicklungspotenzial aufweisen. Des Weiteren ist auch die Vermehrung multipotenter Stammzellen *in vitro* begrenzt, da diese Stammzelltypen entweder nach mehreren Anreicherungsstufen karyotypische Veränderungen oder eine unkontrollierbare Proliferation und Differenzierung *in vitro* bzw. ein karzinogenes Wachstumsverhalten *in vivo* aufweisen (Chaichana et al., 2006; Casalbore et al., 2009).

Um das Problem der eingeschränkten Wachstums- und Differenzierungsfähigkeit zu lösen, wird versucht, adulte Zellen entweder zu de-differenzieren – das heißt, sie in ein Stadium, gekennzeichnet durch ein höheres Entwicklungs- und Proliferationspotenzial, gewissermaßen „zurück“ zu versetzen – oder zu trans-differenzieren – das heißt, sie in somatische Zellen umzuwandeln, welche normalerweise aus einem anderen Keimblatt hervorgehen (Bjornson et al., 1999; Brazelton et al., 2000; Greschat et al., 2008). Jedoch wird der Erfolg der Trans-Differenzierung kontrovers diskutiert, da die so generierten Zellen nur partiell adäquate keimblattspezifische Eigenschaften aufweisen (Terada et al., 2002; Greschat et al., 2008; Xu et al., 2008). Demgegenüber lassen sich mittels De-

Differenzierung adulter Stammzellen bessere Ergebnisse erzielen. So konnte gezeigt werden, dass sich spermatogoniale Vorläuferzellen unter definierten Kulturbedingungen zu pluripotenten Stammzellen entwickeln können (Guan et al., 2006; Conrad et al., 2008; Kossack et al., 2009). In einem anderen Ansatz konnte gezeigt werden, dass durch die genetische Integration spezifischer Transskriptionsfaktoren in multipotente Stammzellen diese „umprogrammiert“ werden können und die daraus resultierenden Zellen dann pluripotent sind (Takahashi and Yamanaka, 2006; Kastenberg and Odorico, 2008; Kaji et al., 2009). Die Methode zur Generierung solcher „induziert-pluripotenten“ Stammzellen (iPS Zellen) konnte in den letzten Jahren zwar verbessert werden, jedoch ist der grundlegende Wirkungsmechanismus unbekannt.

Ein alternativer Ansatz ist, Stammzellen aus embryonalem Gewebe zu isolieren, zu kultivieren und anzureichern. Die größte Potenzialität weisen die Zellen der inneren Zellmasse auf, welche sich bei der Maus, beim Affen und beim Menschen aus der Blastocyste isolieren und *in vitro* kultivieren lassen (Abb. 1; Evans and Kaufman, 1981; Thomson et al., 1995; Thomson et al., 1998). Dabei zeigte sich, dass diese Zellen ein enormes Anreicherungsvermögen aufweisen und sowohl *in vitro* als auch nach Re-Transplantation in den Organismus die Fähigkeit besitzen, in alle somatischen Zellen zu differenzieren (Evans and Kaufman, 1981; Thomson et al., 1998; Reubinoff et al., 2000). Aufgrund des Proliferations- und des Differenzierungspotenzials *in vitro*, werden diese Zellen als pluripotente, embryonale Stammzellen (ES Zellen) bezeichnet. Jedoch wird die Gewinnung humaner ES Zellen aus ethischer Sicht kontrovers diskutiert, da bei der Gewinnung dieser Zellen ein humaner Embryo zerstört werden muss. Bis heute weisen nur die embryonalen, die spermatogonialen und die iPS Zellen *in vitro* die Fähigkeit auf, in alle Zelltypen eines adulten Organismus differenzieren zu können.



**Abb. 1: Schematische Darstellung des Differenzierungspotenzials embryonaler Stammzellen *in vitro* und *in vivo*.** Aus der Blastozyste entwickelt sich *in vivo* die Gastrula, bestehend aus Ekto-, Meso- und Endoderm sowie den Urkeimzellen. Diese embryonalen Zellen sind der Ursprung aller Zellen des adulten Organismus. Isolierte Zellen der inneren Zellmasse einer Blastozyste lassen sich auf Fibroblasten unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren *in vitro* kultivieren und anreichern. Nach Entzug der Wachstumsfaktoren haben diese embryonalen Stammzellen das Potenzial zu allen somatischen und gonosomalen Zellen *in vitro* zu differenzieren. (Modifiziert nach: Kirschstein and Skirboll, 2001)



## 2.2 Anwendung pluripotenter Stammzellen

*In-vitro*-Forschung an pluripotenten Stammzellen bietet die Möglichkeit, deren Entwicklung zu differenzierten somatischen Zellen zu untersuchen. Ein solches Modellsystem kann genutzt werden, um z.B. das Entwicklungspotenzial dieser Zellen zu beobachten und dadurch entwicklungsbiologisch relevante Fragestellungen zu beantworten.

Ein weiteres mögliches Einsatzgebiet Stammzell-abgeleiteter spezifischer somatischer Zellen ist die Zellersatztherapie im Rahmen der regenerativen Medizin. Deren Ziel ist der funktionelle Ersatz untergegangener oder funktionsuntüchtiger Zellen eines Gewebes durch *in vitro* generierte Zellen. Diese Behandlungsmethode könnte bei Krankheiten angewandt werden, die einhergehen mit dem Verlust einer spezifischen Zellart, welche nicht durch endogene Regeneration aus multipotenten Stammzellen kompensiert werden kann. Dies gilt z.B. für den Diabetes mellitus, Myokarddegenerationen oder neurodegenerative Krankheiten wie Morbus Parkinson oder Chorea Huntington. Ziele einer Transplantationstherapie können zudem sein, die Regeneration des Wirtsorganismus durch Faktoren zu fördern, welche von den transplantierten Zellen sezerniert werden und die Heilung des geschädigten Organs verbessern. Neben diesen Anwendungszielen bestehen aber auch Risiken. Zum einen besteht die Gefahr der Tumorbildung, die nach Transplantation auftreten kann und entweder von restlichen ES Zellen oder von differenzierteren Zellen, die eine fehlerhafte Zellzyklus-Kontrolle aufweisen, ausgeht (Nishimura et al., 2003; Arnhold et al., 2004). Zum anderen könnten ES Zell-abgeleitete Zellen nach der Transplantation nicht die benötigten spezifischen Eigenschaften aufweisen, die für eine vollständige funktionelle Regeneration nötig wären (Nishimura et al., 2003; Webber et al., 2007).

Einen weiteren Bereich der Stammzellforschung stellt das sogenannte „tissue engineering“ (englisch nach *tissue* = Gewebe, *engineering* = Entwicklung) dar (Kirouac and Zandstra, 2008; Bratt-Leal et al., 2009; Hwang et al., 2009). Hierzu werden Stammzellen *in vitro* zur Generierung von Gewebestrukturen verwendet. Diese sollen als zugängliches *In-vitro*-Modellsystem dienen um z.B. die Funktion der Zellen im Zellverband zu untersuchen und später als Gewebeprotthese angewendet werden. In diesem Zusammenhang konnten *in vitro* Herzgewebestrukturen aus ES Zellen hergestellt und deren Funktionalität im zellulären Zellverband untersucht werden (Hescheler and Fleischmann, 2001; Lindner et al., 2002; Reppel et al., 2004; Yeung et al., 2009). Des

Weiteren lassen sich aus ES Zellen ganze neuronale Zellpopulationen gewinnen, deren Funktion bis dato nur auf Einzelzellebene untersucht wurde.

## 2.3 Neurale Entwicklung pluripotenter Stammzellen *in vitro*

### Vergleich der zellulären neuralen Entwicklung von ES Zell-abgeleiteten neuralen Stammzellen und neuralen Stammzellen *in vivo*

In den letzten Jahren wurde zur Generierung neuraler Zellen aus ES Zellen eine Vielzahl an Protokollen publiziert (Okabe et al., 1996; Ying et al., 2003; Bibel et al., 2004; Conti et al., 2005; Watanabe et al., 2005; Roy et al., 2006; Wilson and Stice, 2006; Nat et al., 2007; Koch et al., 2009). Dabei zeigte sich, dass *in vitro* viele Entwicklungsprozesse rekapituliert werden, die auch *in vivo* bei der Gehirnentwicklung ablaufen (Götz and Barde, 2005; Götz and Huttner, 2005; Watanabe et al., 2005; Liour et al., 2006; Wilson and Stice, 2006; Nat et al., 2007; Elkabetz et al., 2008; Okada et al., 2008; Koch et al., 2009). So lässt sich sowohl bei der neuralen Differenzierung muriner als auch humaner ES Zellen die Bildung multipotenter neuraler Stammzellen beobachten, welche sich epithelartig zusammenlagern und daher als neuroepitheliale (NE) Zellen bezeichnet werden. Diese Zellen bilden *in vivo* das Neuralrohr aus und sind der Ursprung aller Neurone und Gliazellen des zentralen Nervensystems. Bei der neuralen Differenzierung *in vitro* bilden ES Zell-abgeleitete NE Zellen Neuralrohr-ähnliche Strukturen aus, welche als neurale Rosetten bezeichnet werden. Eine neurale Rosette besteht initial aus NE Zellen, welche sich radial nebeneinander lagern und somit eine runde, mehrschichtige Struktur mit einem zentralen Lumen bilden. Der geschichtete Aufbau des Neuralrohrs bzw. der neuralen Rosetten ist bedingt durch die sogenannte interkinetische nukleäre Migration (INM)<sup>2</sup> der NE Zellen. In der apikalen, d.h. dem Ventrikel bzw. Lumen zugewandten Region, befinden sich NE Zellen, welche entweder symmetrisch proliferieren, also zwei neue multipotente NE Zellen hervorbringen, oder in unipotente neuronale Vorläuferzellen oder multipotente radiale Glia (RG) Zellen differenzieren. Neuronale Vorläuferzellen migrieren entlang zellulärer Ausläufer der RG Zellen nach basal, also in Richtung der dem Ventrikel bzw. Lumen abgewandten Region an der späteren Hirnoberfläche. Hier erfolgt

---

<sup>2</sup> Die INM bezeichnet die Korrelation der Migration des Zellkerns von embryonalen neuralen Stammzellen zu spezifischen Zellzyklusphasen. So liegt der Zellkern bei der Mitose an der apikalen Seite und bei der S-Phase an der basalen Seite des neuralen Gewebes vor. Innerhalb der G-Phasen migriert der Zellkern zwischen den Seiten hin und her.

deren terminale Differenzierung und Reifung in Neurone u. a. bei der Entwicklung des zerebralen Kortex. Zeitgleich entwickeln sich apikal aus NE Zellen fortwährend RG Zellen, welche schließlich die Population der NE Zellen ersetzen. RG Zellen ermöglichen nicht nur die neuronale Migration der neuralen Vorläuferzellen, sondern fungieren selbst als sekundäre neurale multipotente Stammzellen, aus denen sich zuerst Neurone und dann Gliazellen bilden. Der Verlauf der Entwicklung dieser unterschiedlichen neuralen Zelltypen lässt sich mit spezifischen Markern *in vitro* und *in vivo* immunzyto- bzw. immunhistochemisch verfolgen. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass innerhalb muriner und humaner ES Zell-abgeleiteter neuraler Rosetten die Neuro- und Gliogenese in einem zur *In-vivo*-Situation vergleichbaren zeitlichen und räumlichen Muster abläuft (Temple, 2001; Götz and Barde, 2005; Götz and Huttner, 2005; Eiraku et al., 2008; Gaspard et al., 2009b; Gaspard et al., 2009a).

### ***In-vivo*-Regionalisierung embryonaler neuraler Stammzellen**

Neben der zellulären Entwicklung erfolgt *in vivo* eine fortschreitende Regionalisierung des embryonalen neuralen Gewebes, welche die Bildung unterschiedlicher Gehirnregionen ermöglicht. Dieser Entwicklungsprozess wird von einer Vielzahl verschiedenster extrinsischer und intrinsischer Faktoren reguliert, die das Entwicklungspotenzial der neuralen Stammzellen beeinflussen und determinieren. Die extrinsischen Faktoren lassen sich unterteilen in sezernierte Morphogene<sup>3</sup> und in Zelloberflächen-verankerte Moleküle. Beide wirken durch die Bindung an entsprechende membranständige Rezeptoren und der daraus resultierenden Initiierung von Signalkaskaden. Auf diese Weise kommt es entweder zur Repression oder Expression, sowie zur Inaktivierung bzw. Aktivierung von verschiedenen auf Genebene regulatorischen Elementen, wie Transkriptionsfaktoren, mikro-RNAs oder epigenetischen Faktoren (Götz and Huttner, 2005; Tannahill et al., 2005; De Pietri Tonelli et al., 2008).

Eine Vielzahl von *In-vivo*-Studien zeigen dass, während der frühen neuralen Entwicklung, durch Konzentrationsgradienten verschiedenster Morphogene, wie z.B. BMP (*Bone Morphogenetic Protein*), TGF (*Transforming Growth Factor*), FGF (*Fibroblast Growth Factor*), Wnt (*Wingless-related MMTV Integration Site*), Faktoren der Hedgehog-Familie oder Retinsäure, das embryonale Neuralrohr entlang der rostro-kaudalen und

---

<sup>3</sup> Morphogen ist ein Faktor, der innerhalb eines Zellverbandes vorliegt und in einer konzentrations-abhängigen Weise das Differenzierungspotenzial der Zellen reguliert.

dorso-ventralen Achse in verschiedene Regionen unterteilt wird (Liu and Niswander, 2005; Tannahill et al., 2005; Fuccillo et al., 2006; Maden, 2007). Diese Regionalisierung wird durch eine regionspezifische Expression von Transkriptionsfaktoren vermittelt, die die Entwicklungen unreifer Zellen intern vorprogrammieren.

So exprimieren im embryonalen Gehirn alle NE Zellen die Transkriptionsfaktoren SOX-(*SRY-box-containing-gene*-)1, -2 und -3, während nur neurale Stammzellen des Telenzephalons den Transkriptions-Repressor Bf-1 (*Brain Factor 1*, auch als *Forkhead Box G1* bezeichnet) exprimieren. Das Telenzephalon selbst ist in unterschiedliche Regionen unterteilt, die ebenfalls durch spezifische Transkriptionsfaktorprofile charakterisiert werden. So lassen sich nur im dorsalen Telenzephalon PAX (*Paired Box*) -6 exprimierende neurale Stammzellen nachweisen, während Stammzellen, die Nkx (*NK2 Homeobox*) -2.1 exprimieren, nur in den ganglionischen Eminenzen des ventralen Telenzephalons vorkommen. Diese beiden Transkriptionsfaktoren determinieren neurale Stammzellen hinsichtlich der Generierung spezifischer neuronaler Vorläuferzellen. So entwickeln sich aus PAX-6-exprimierenden neuronalen Vorläuferzellen nur glutamaterge, exzitatorische Neurone, während sich aus den Nkx-2.1-exprimierenden Zellen nur GABAerge (GABA =  $\gamma$ -Aminobuttersäure), inhibitorische Neurone entwickeln (Götz and Huttner, 2005; Wonders and Anderson, 2006).

Dieses Beispiel macht deutlich, dass während der neuralen Entwicklung durch den Einfluss extrinsischer Faktoren unterschiedliche Regionen entstehen, die sich aus neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen mit einem ortsspezifischen genetischen Hintergrund zusammensetzen. Dieser genetische Hintergrund determiniert die neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen hinsichtlich der Ausbildung eines bestimmten neuronalen Phänotyps. Dabei verbleiben diese Vorläuferzellen entweder in der Nähe ihres Bildungsortes, um sich lokal an der Ausbildung der entsprechenden Gehirnstruktur zu beteiligen, oder wandern in andere Regionen ein, um dort in eine entsprechende neuronale Subpopulation zu differenzieren. Auf diese Weise entstehen verschiedene Gehirnareale, die sich hinsichtlich ihrer neuronalen Zusammensetzung unterscheiden.

### ***In-vitro*-Regionalisierung ES Zell-abgeleiteter neuraler Stammzellen**

Wie *in vivo*, wird auch *in vitro* die neurale Entwicklung von ES Zell-abgeleiteten neuronalen Stammzellen durch extrinsische und intrinsische Faktoren reguliert.

Durch die Zugabe von Morphogenen in das Kulturmedium lässt sich das Transkriptionsfaktorprofil der ES Zell-abgeleiteten neuronalen Stamm- bzw. Vorläuferzellen

ändern. Hierdurch können unterschiedliche neuronale Zellen, wie z.B. kortikale glutamaterge Neurone, mesenzephal dopaminerge Neurone oder spinale Motoneurone *in vitro* generiert werden (Bibel et al., 2004; Wilson and Stice, 2006; Koch et al., 2009). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass der Großteil ES Zell-abgeleiteter NE Zellen, ohne Einfluss extern applizierter Morphogene, sich bevorzugt zu telencephalen Neuronen entwickelt (Watanabe et al., 2005; Eiraku et al., 2008; Gaspard et al., 2009b; Koch et al., 2009). Daher wird vermutet, dass *in vitro* ein automatisch ablaufendes anterior-telencephales Entwicklungsprogramm bei ES Zell-abgeleiteten neuronalen Zellen besteht. In diesem Zusammenhang zeigte sich, dass eine Umprogrammierung des regionalen Codes durch Zugabe von Morphogenen im Wesentlichen nur im NE Zell Stadium erfolgen kann (Conti et al., 2005; Elkabetz et al., 2008; Koch et al., 2009). Die Kompetenz neuraler Stammzellen, auf instruktive Signale zu reagieren und daraufhin eine spezifische anteriore oder posteriore Identität anzunehmen, ist somit *in vitro* wie auch *in vivo* nur während der frühen neuronalen Entwicklung gegeben. Zeitgleich zur Determinierung der anterior-posterioren neuronalen Identität erfolgt die Bestimmung der dorso-ventralen und medial-lateralen Identität.

Somit wird deutlich, dass pluripotente Stammzellen nicht nur zur Generierung neuraler Zellen verwendet werden können, sondern auch als Modellsystem dienen, um eine Vielzahl von Entwicklungsprozessen der Neuro- und Gliogenese *in vitro* zu untersuchen.

## **2.4 Funktionalität ES Zell-abgeleiteter neuronaler Zellen**

Neben diesen Arbeiten zur Bestimmung der neuronalen, zellulären Hierarchie und des neuronalen Entwicklungspotenzials embryonaler Stammzellen, zeigen viele Arbeiten, dass sich ES Zell-abgeleitete neurale Zellen *in vitro* zu Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten entwickeln können (z.B. Conti et al., 2005; Glaser et al., 2005).

Neurone sind Zellen die Informationen mittels elektrischer Signale über Neuriten – das sind spezialisierte Zellfortsätze – auf andere Neurone übertragen können. Die neuronale Übertragung erfolgt entweder direkt über elektrische Verbindungen, sogenannte „Gap-Junctions“, oder indirekt über Synapsen (Purves, 2006). An den Synapsen erfolgt die Transformation des elektrischen Signals in ein chemisches Signal, dem Neurotransmitter, welches die elektrischen Eigenschaften des post-synaptischen Neurons verändert und somit ein moduliertes elektrisches Signal in diesem hervorrufen kann. Astrozyten sind ebenfalls über Gap-Junctions miteinander verbunden und regulieren die neuronale Kommunikation

an den neuronalen Synapsen. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass diese neuro-gliale Verbindung essentiell für die Kommunikation zwischen den Neuronen ist und somit Neurone und Astrozyten funktionell voneinander abhängig sind (Kafitz et al., 2000; Slezak and Pfrieger, 2003; Angulo et al., 2004; Bennay et al., 2008; Fellin et al., 2009).

Oligodendrozyten bilden zelluläre Fortsätze aus, welche sich um die Neuriten legen, was zur Folge hat, dass die Geschwindigkeit der elektrischen Weiterleitung erhöht wird. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Unterpopulation von Gliazellen ebenfalls Aktionspotenziale generieren können, wobei es noch unbekannt ist, was für eine Funktion diese elektrischen Signale haben (Karadottir et al., 2008).

Mittels verschiedener Nachweismethoden auf Protein- und Genexpressionsebene konnte gezeigt werden, dass sowohl murine als auch humane ES Zell-abgeleitete Neurone sowohl Neuriten als auch Synapsen ausbilden und es zur Expression spezifischer Neurotransmitter-Rezeptoren kommt. Zudem konnte die elektrische Aktivität von ES Zell-abgeleiteten Neuronen mittels der Patch-Clamp-Technik<sup>4</sup> gezeigt werden (Bain et al., 1995; Bibel et al., 2004; Lang et al., 2004; Goetz et al., 2006; Koch et al., 2009). Ergänzende pharmakologische Untersuchungen, mit denen die Aktivität von Neurotransmitter-Rezeptoren manipuliert werden kann, zeigten, dass ES Zell-abgeleitete Neurone an den Synapsen Neurotransmitter ausschütten und dadurch die neuronale Aktivität am post-synaptischen Neuron regulieren können. Darüber hinaus zeigten Transplantationsstudien von murinen ES Zell-abgeleiteten neuralen Vorläuferzellen in Mausembryonen, dass sie im Wirtsgewebe zu Neuronen ausreifen können und in der Lage sind mit den Neuronen des Wirts funktionelle Synapsen auszubilden (Wernig et al., 2004; Muotri et al., 2005). So existieren zwar viele Transplantationsstudien bei denen murine oder humane ES Zell-abgeleitete neurale Zellen in Tiermodelle für neurologische Erkrankungen transplantiert wurden (Perez-Bouza et al., 2005; Buhmann et al., 2006; Roy et al., 2006; Shindo et al., 2006; Zhang et al., 2006; Webber et al., 2007), ein direkter Zusammenhang zwischen den häufig zu beobachtenden Verhaltensverbesserungen nach Transplantation und der simultan beobachteten adäquaten terminalen neuronalen Differenzierung einiger transplantierte Vorläuferzellen ist jedoch damit nicht bewiesen. Es kann nämlich nur im besten Fall vermutet werden, dass die transplantierten Zellen

---

<sup>4</sup> Patch-Clamp-Technik ist eine Technik zur Messung der elektrischen Eigenschaften von elektrisch-aktiven Zellen. Dabei wird eine Glaselektrode verwendet, die die Zelle penetriert, um die Spannung bzw. Ströme, die über der Membran vorhanden sind, zu detektieren. Diese erlaubt die direkte Messung von Einzelkanalströmen.

quantitativ und qualitativ neue neuronale Strukturen ausbilden, funktionelle Verbindungen mit dem Wirtsgehirn aufbauen und somit die Regeneration des zerstörten Gewebes durch neue neuronale Funktionalität erfolgt. Es ist jedoch auch möglich, dass die transplantierten Zellen Faktoren ausschütten, welche sekundär die Regenerationsprozesse im geschädigten Gewebe verbessern, ohne selbst einen spezifisch neuronalen Phänotyp zu exprimieren (Bregman et al., 2002; Nakamura et al., 2005).

## **2.5 Eigenschaften von Neuronen *in vivo* und *in vitro***

Die Besonderheit eines Neurons ist die Fähigkeit ein Aktionspotenzial zu generieren. Bei einem Aktionspotenzial handelt es sich um ein von einem Neuron aktiv gebildetes, elektrisches Signal, welches u. a. als Spannungsänderung gegenüber dem Ruhepotential über der Zellmembran mittels der Patch-Clamp-Technik messbar ist. Dieses Signal wird über Neuriten weitergeleitet und letztendlich über chemische Synapsen auf andere Neurone übertragen. In einer neuronalen Zellpopulation sind auf diese Weise viele Neuronen miteinander verbunden und bilden ein neuronales Netzwerk. Die Signalgenerierung und Weiterleitung lässt sich auf Einzelzellebene mittels der Patch-Clamp-Technik genau untersuchen und ermöglicht eine detaillierte Aussage über die Funktionsweise und Kinetik von Neurotransmitter-Rezeptoren und Ionenkanälen (Purves, 2006). Da in einem neuronalen Netzwerk jedoch viele Neurone funktionell miteinander verbunden sind, können diese ein komplexes Aktivitätsmuster innerhalb der neuronalen Population generieren, welches sich mit einer einzigen Messelektrode, die einzelne Neurone ableitet, nicht erfassen ließe. Um solche neuronalen Aktivitätsmuster zu messen, bedarf es Techniken, welche die neuronale Aktivität einer ganzen neuronalen Zellpopulation gleichzeitig erfassen können. In diesem Zusammenhang ist die Patch-Clamp-Technik aus oben genannten Gründen und da sie nur Messungen über Stunden ermöglicht und die Penetration der Zellmembran zum Zelltod des abgeleiteten Neurons führt nur bedingt anwendbar. Somit werden zur Erfassung der neuronalen Netzwerkaktivität Methoden angewendet, die eine Langzeitmessung einer neuronalen Population ermöglichen und nicht den neuronalen Zelltod zur Folge haben.

Um die neuronale Netzwerkaktivität im Organismus oder *in vitro* zu messen und zu beobachten, gibt es verschiedene Ansätze. Die Beobachtung der neuronalen Aktivität am lebenden Organismus kann indirekt durch die Erfassung der Gehirnaktivität mittels der funktionellen Magnetresonanz-Tomographie (fMRT) sowie der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) erfolgen oder direkt durch elektrophysiologische Messmethoden. Zu

diesen Methoden gehören die nicht-invasive Elektroenzephalographie (EEG) und die Magnetoenzephalographie (MEG). Demgegenüber stehen die invasiven Messmethoden, wie das Elektrokortikogramm (EKoG) und die Anwendung von Multi-Messelektrodeneinheiten (engl. nach *Multiunit Array* = MU), sowie die Visualisierung von spannungssensitiven Substanzen. Bei dem EKoG- und bei den MU-Untersuchungen stehen die Messelektroden in direktem Kontakt mit dem neuronalen Gewebe und erfassen somit dessen neuronale Aktivität als Änderung des Feldpotentials (Kasanetz et al., 2006). Obwohl die nicht-invasiven Methoden und die Visualisierung von spannungssensitiven Substanzen globale neuronale Aktivität beschreiben können, ist die räumliche und zeitliche Auflösung begrenzt. Demgegenüber erreichen invasive Methoden aufgrund der räumlichen Nähe zwischen Messelektrode und neuronaler Zelle eine Auflösung, welche es ermöglicht, die Aktivität eines einzelnen Neurons zur Aktivität der ganzen neuronalen Population zu korrelieren. Jedoch sind diese Invasivmethoden am Menschen, hinsichtlich der Messungen neuronaler Aktivitäten von tiefer liegenden Strukturen, wie z.B. des Hippokampus oder des Striatums, nicht anwendbar. Daher erfolgt die Messung an solchen Gehirnregionen, zumindest für experimentelle Fragestellungen, an Tieren. So zeigen EKoG- und MU-Messungen z.B. in kortikalen Strukturen, dass sich an mehreren räumlich von einander getrennten Elektroden zeitgleich ein Aktivitätsmuster beobachten lässt (Beispiel (Mahon et al., 2001; Kasanetz et al., 2006)). Dabei handelt es sich um sogenannte synchrone „Bursts“, die von mehreren Neuronen nahezu zeitgleich generiert werden. Ein Burst besteht aus einer Gruppe von zeitlich dicht aufeinander folgenden Aktionspotenzialen bzw. „Spikes“. Ein Spike ist ein durch eine in der Nähe des Neurons positionierte Messelektrode gemessenes Signal und stellt eine Änderung des Feldpotentials zwischen der Messelektrode und der Null-Elektrode dar, welche sich beim Auftreten eines Aktionspotenzials ereignet. Damit handelt es sich bei synchronen Bursts um Aktivitätsmuster, welche von mehreren Neuronen generiert werden und sich über eine neuronale Zellpopulation ausbreiten.

Synchronisierte Burstaktivität neuronaler Netzwerke wird in vielen verschiedenen Hirnregionen beobachtet und als eine grundlegende Eigenschaft von Kodierungsprozessen und Prozessen zur Informationsverarbeitung im Gehirn angesehen (Singer, 1999; Sturm and Konig, 2001; Buzsaki and Draguhn, 2004; Kasanetz et al., 2006). Interessanterweise bilden auch *in vitro* kultivierte, isolierte Schnittkulturen sowie dissoziierte neuronale Kulturen diverser Hirnareale diese synchronisierte Burstaktivität aus. Dies konnte durch die Kultivierung von Gehirnschnitten bzw. dissoziierter neuronaler Zellen gezeigt werden,

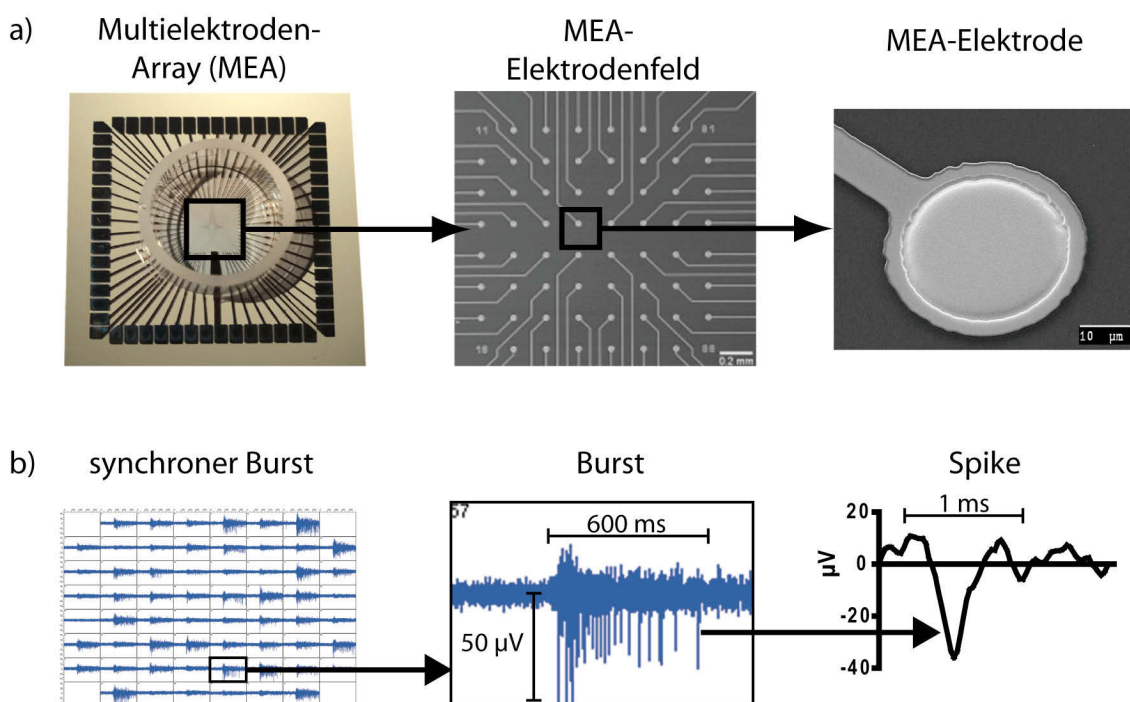


die auf sogenannten Multielektroden-Arrays (MEAs) gezüchtet wurden (van Bergen et al., 2003; Beggs and Plenz, 2004; Hofmann and Bading, 2006; Ayali et al., 2007). Dabei handelt es sich um Systeme aus Metallelektroden und Dünnschichtleiterstrukturen auf einem Glassubstrat mit denen erstmals 1977 extrazelluläre Signale von Neuronen abgeleitet werden konnten (Gross et al., 1977). Daneben konnte auch gezeigt werden, dass Chips mit Feldeffekttransistoren auf Siliziumbasis verwendet werden können, um die neuronale Netzwerkaktivität zu messen (Fromherz et al., 1991). Sowohl MEAs als auch Feldeffekttransistoren bieten die Möglichkeit, die Zellen elektrisch zu stimulieren (Gross et al., 1993; Fromherz and Stett, 1995), um somit externe Stimuli zu simulieren und deren Einfluss auf die Entwicklung der Aktivitätsmuster des neuronalen Netzwerkes zu untersuchen. Die Kategorisierung solcher neuronalen Netzwerkaktivitätsmuster erfolgt zum einen anhand der Frequenzen des Auftretens solcher Bursts (Inter-Burst-Interval), und zum anderen durch die Anzahl und Frequenz der Spikes (Inter-Spikes-Intervall), die in einem Burst organisiert sind (Tateno et al., 2002; Van Pelt et al., 2004; Wagenaar et al., 2006). Daher dienen neurale Kulturen auf MEAs als Modellsystem, um die Rolle synchroner Burstaktivität bei synaptischer Plastizität (Arnold et al., 2005), bei Epilepsie (Yaari and Beck, 2002) sowie bei der Entwicklung funktioneller Netzwerke *in vitro* zu untersuchen (Chiappalone et al., 2006).

Innerhalb neuronaler Netzwerke gibt es wiederum auch Neurone, welche zwar funktionell in ein neuronales Netzwerk eingebunden sind, deren intrinsische Aktivität aber nicht zwangsläufig abhängig ist von der neuronalen Netzwerkaktivität. Diese Neurone, welche über einen endogenen Taktgeber verfügen, lassen sich in verschiedensten Gehirnarealen nachweisen und sind z.B. an der Regulation des Schlafrhythmus beteiligt (Aton et al., 2006; Herzog, 2007), ermöglichen die räumliche Orientierung (Moser et al., 2008) oder regulieren Bewegungsprozesse (Darbon et al., 2003; Yvon et al., 2007). Auch *in vitro* lassen sich solche Zellen identifizieren. So finden sich in Kulturen neokortikaler Neurone pyramidale Zellen, die intrinsische Burstaktivität aufzeigen und solche, die regelmäßige Aktionspotenziale mit niedriger Frequenz generieren (Guatteo et al., 1994; Franceschetti et al., 1995). Daneben weisen auch Interneurone unterschiedliche Fähigkeiten zur endogenen Burstgenerierung auf (Gibson et al., 1999; Markram et al., 2004). Aufgrund ihrer intrinsischen Eigenschaften können solche Neurone als Schrittmacher („Pacemaker“-Neurone) fungieren um synchrone Netzwerkaktivität zu induzieren, wobei die Aktivität des Pacemaker-Neurons durch spannungs- und zeitabhängige Ionenströme bestimmt wird (Ramirez et al., 2004). Neuronale Netzwerke

auf MEAs erlauben es daher auch zu untersuchen, wie sich intrinsisch aktive Neurone und das neuronale Netzwerk gegenseitig beeinflussen.

Die Ausbildung funktioneller neuronaler Netzwerke ist sowohl *in vivo* wie auch *in vitro* abhängig von der synaptischen Vernetzung der Neurone aber auch von der funktionellen Kommunikation zwischen Neuronen und Astrozyten. Somit stellte sich die Frage, ob über die Funktionaliät auf Einzellzebene hinaus, ES Zell-abgeleitete Populationen auch funktionelle neuronale Netzwerke bilden können.



**Abb. 2: Aufbau und Messungen von einem Multielektroden-Array (MEA).** a) Dargestellt sind ein MEA und ein MEA-Elektrodenfeld, das sich aus einer Vielzahl von Metallelektroden und einer Dünnschichtleiterstruktur zusammensetzt. b) MEA-Messung eines synchronen Burst, der von einer kortikalen primären neuronalen Zellpopulation (21 Tage in Kultur) generiert wurde. Jedes Kästchen zeigt die Burstaktivität, welche von einer Elektrode gemessen wurde. Jeder Burst besteht aus einer Gruppe von Spikes. (a) Modifiziert nach: Fleischer, 2004 b) Zur Verfügung gestellt von Nevena Tzekova.)

### 3 Zielsetzung

Neurale Zellen weisen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* die Fähigkeit auf, sich zu einem funktionellen neuronalen Netzwerk zu organisieren. Da es möglich ist, aus embryonalen Stammzellen (ES Zellen) neurale Zellen *in vitro* zu generieren, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob sich *in vitro* aus ES Zellen neuronale Netzwerke bilden lassen.

1. Mittels der MEA-Technologie sollte überprüft werden, ob diese ES Zell-abgeleiteten Neurone ein elektrophysiologisch aktives neuronales Netzwerk bilden können. Dafür sollten murine ES Zellen *in vitro* anhand eines neuronalen Differenzierungsprotokolls zu neuronalen Zellen differenziert und auf den MEA-Chips kultiviert werden. Mittels dieser nicht-invasiven Messmethode sollte als erstes überprüft werden, ob und wann sich synchrone neuronale Aktivitätsmuster in ES Zell-abgeleiteten neuronalen Populationen beobachten lassen. Das Auftreten zeitlich synchroner neuronaler Aktivität wäre ein direkter Beweis für die funktionelle Kommunikation ES Zell-abgeleiteter neuronaler Populationen. Neben der Beschreibung der elektrophysiologischen und morphologischen Entwicklung ES Zell-abgeleiteter neuronaler Netzwerke, sollte mittels immunzytochemischer Methoden überprüft werden, ob die elektrophysiologische Entwicklung mit einer quantitativen Änderung der Anzahl der Neuriten oder Synapsen einhergeht. Es sollten zum einen mittels immunzytochemischer Methoden exzitatorische und inhibitorische Neurone nachgewiesen werden. Des Weiteren sollte deren Einfluss auf die neuronale Netzwerkaktivität durch pharmakologische Experimente untersucht werden. ES Zell-abgeleitete neuronale Netzwerke sollten mit neuronalen Netzwerken generiert aus primären neuronalen Kulturen verglichen werden.

2. Ein Problem von Langzeitkulturen ES Zell-abgeleiteter Zellen ist das Auftreten nicht-neuraler Zellen. Daher sollte die neurale Differenzierung so weit optimiert werden, dass zum einen die Bildung von nicht neuronalen Zellen ausgeschlossen wird, zum anderen aber das Potenzial der neuronalen Zellen zur Ausbildung eines funktionellen Netzwerkes hierdurch nicht beeinträchtigt wird.

3. Um eine direkte klinische Anwendbarkeit ES Zell-abgeleiteter neuronaler Netzwerke zu erkunden, sollte erstens überprüft werden, ob diese unter dem Einfluss von humanem Liquor cerebrospinalis (engl. nach *cerebrospinal fluid* = CSF) aktiv sind. Humane

Liquores wurden gewählt aufgrund der Tatsache, dass ihre Zusammensetzung der extrazellulären Flüssigkeit, die auch Neurone umgibt und deren Aktivität ermöglicht, ähnelt. Zweitens sollte untersucht werden, ob pathologisch veränderte Liquores auch Änderungen in der neuronalen Netzwerkaktivität erzeugen. Hierzu wurden Liquores von Patienten mit schwerem Schädel-Hirn-Trauma verwendet. Die Untersuchungen sollten vergleichend mit murinen ES Zell-abgeleiteten sowie primären neuronalen Netzwerken aus der Ratte durchgeführt werden. Durch chemische Analysen fraktionierter Liquorproben und pharmakologische Experimente sollten die Molekülgruppen bestimmt werden, welche die möglichen Änderungen der neuronalen Netzwerkaktivität bedingen.

Insgesamt war das Ziel der oben genannten Experimente, entwicklungsbiologische, System-neurophysiologische und klinisch neurologisch relevante Fragen zu beantworten.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Generierung ES Zell-abgeleiteter neuraler Stamm- und Vorläuferzellen

Um eine neurale Zellpopulation aus embryonalen Stammzellen zu generieren, die in der Lage ist ein funktionelles neuronales Netzwerk zu bilden, wurden im Laufe dieser Arbeit folgende Differenzierungsmethoden angewendet. Erstens, ein Selektionsprotokoll, welches erstmals von Okabe und Kollegen (1996) beschrieben wurde. Zweitens, ein neurales Induktionsprotokoll zur Herstellung „Serum-free, Floating Cultures of Embryoid Body-like Aggregates“ (SFEB) (Barberi et al., 2003; Watanabe et al., 2005), welches auch Ausgangspunkt zur Bildung sekundärer neuraler Zellpopulationen (SNP) oder adhären wachsender neuraler Vorläuferzellen (engl. nach *monolayer neural precursors* = MNP) ist (Abb. 3; Conti et al., 2005; Illes et al., 2009).

Beiden oben genannten Protokollen ist gemeinsam, dass initial freischwebende ES Zellaggregate in einem serumhaltigen Medium ohne den Wachstumsfaktor LIF (*leukemia inhibitory factor*) kultiviert werden (Abb. 3 I). Unter diesen Bedingungen differenzieren die ES Zellen innerhalb dieser Aggregate in einem Zeitrahmen von vier Tagen in ekto-, endo- oder mesodermale Zellen und bilden nun als „Embryoid Body“ (EB) bezeichnete Aggregate (Abb. 3a, 1).

Bei der Anwendung des neuralen Selektionsprotokolls werden vier Tage alte EBs auf mit spezifischen Substraten beschichteten Zellkulturplatten kultiviert (Abb. 3a, 2). Hiernach werden diese Kulturen unter Wachstumsbedingungen gehalten, die das Überleben neuraler Vorläuferzellen fördern, während nicht neurale Vorläuferzellen größtenteils absterben (Okabe et al., 1996). Nach diesem Selektionsschritt werden die Zellen mit den Wachstumsfaktoren FGF-2 und EGF (*Epidermal Growth Factor*) expandiert und passagiert. Hierdurch entsteht eine Population multipotenter neuraler Vorläuferzellen (Abb. 3a, 3). Jedoch ist die Anreicherung solcher Zellen unter diesen Bedingungen begrenzt, da die so entstandenen Kulturen mit ansteigender Passagezahl ein immer eingeschränkteres Differenzierungspotential aufweisen. Bedingt hierdurch, setzt sich eine solche Kultur nach zehn bis fünfzehn Passagen vorwiegend aus glialen Vorläuferzellen zusammen (Abb. 3a, 4; Okabe et al., 1996). Hinzu kommt, dass dem Selektionsprozess unreife ES Zellen oder nicht neurale Zellen entgehen können, die spätere

*In-vitro-* oder *In-vivo*-Experimente negativ, in Form gestörter Funktion oder Tumorwachstum, beeinflussen. Daher wurden in den letzten Jahren weitere Protokolle entwickelt, die zum einen die Effektivität der neuralen Differenzierung erhöhen und zum anderen die Reinheit ES Zell-abgeleiteter neuraler Stammzellkulturen verbessern. So werden, im Gegensatz zu dem neuralen Selektionsprotokoll, bei der Generierung von SFEB-, SNP- und MNP-Kulturen die ES Zellaggregate nur einen Tag in einem serumhaltigen Medium kultiviert, bevor sie anschließend für weitere sieben Tage in einem serumfreien neuralen Induktionsmedium gezüchtet werden (Abb. 3, II). Dieser Schritt fördert die neurale Induktion<sup>5</sup> von ES Zellen in Richtung neuroektodermaler Zellen und vermindert gleichzeitig die vornehmlich serumvermittelte endo- und mesodermale Entwicklung (Watanabe et al., 2005). Diese zellulären Strukturen werden als SFEB bezeichnet. SFEB-Aggregate bilden sowohl die Grundlage zur Generierung von „neural precursor cell-enriched“ SFEB (nSFEB) und deren Nachkommenschaft, die SNP (Abb. 3b), sowie auch die Grundlage zur Generierung von MNP-Kulturen (Abb. 3c).

Die Herstellung von nSFEB- oder SNP-Kulturen beginnt mit der Anreicherung neuraler Stammzellen innerhalb der SFEB. Dazu werden, während der frei schwimmenden Kultivierungsphase der SFEB, die Wachstumsfaktoren FGF-2 und EGF zum Kulturmedium hinzu gegeben, was zur Folge hat, dass neurale Stammzellen proliferieren und es zu einer Größenzunahme der SFEB kommt. Die mechanische Zerteilung der SFEB und Kultivierung von SFEB-Fragmenten in Proliferationsmedium, führt zur Ausbildung neuer Aggregate, die eine erhöhte Anzahl neuraler Stammzellen bzw. Vorläuferzellen aufweisen und deren Anteil restlicher ES Zellen oder nicht-neuraler Zellen vermindert ist (Nat et al., 2007). Auf diese Weise bilden sich innerhalb von zehn bis 14 Tagen nSFEB (Abb. 3b, 1). Nat und Kollegen (2007) zeigten erstmals mittels immunozytochemischer Methoden, dass auf ein Lamininsubstrat kultivierte humane ES Zell-abgeleitete nSFEB sequentiell neurale Zellen bilden, die aus den Aggregaten heraus migrieren und einen dichten Zellrasen bilden. Dies konnte ebenfalls in der vorliegenden Arbeit mit murinen nSFEB beobachtet werden. Zusätzlich zeigen immunozytochemische Analysen, dass die Zellpopulation die innerhalb der ersten fünf bis sieben Tage aus den nSFEB heraus migriert, keine Oct-4<sup>6</sup>-positiven Zellen mehr aufweist, was darauf hinweist, dass sich in dieser Zellpopulation keine pluripotenten Stammzellen mehr befinden. Diese Beobachtung

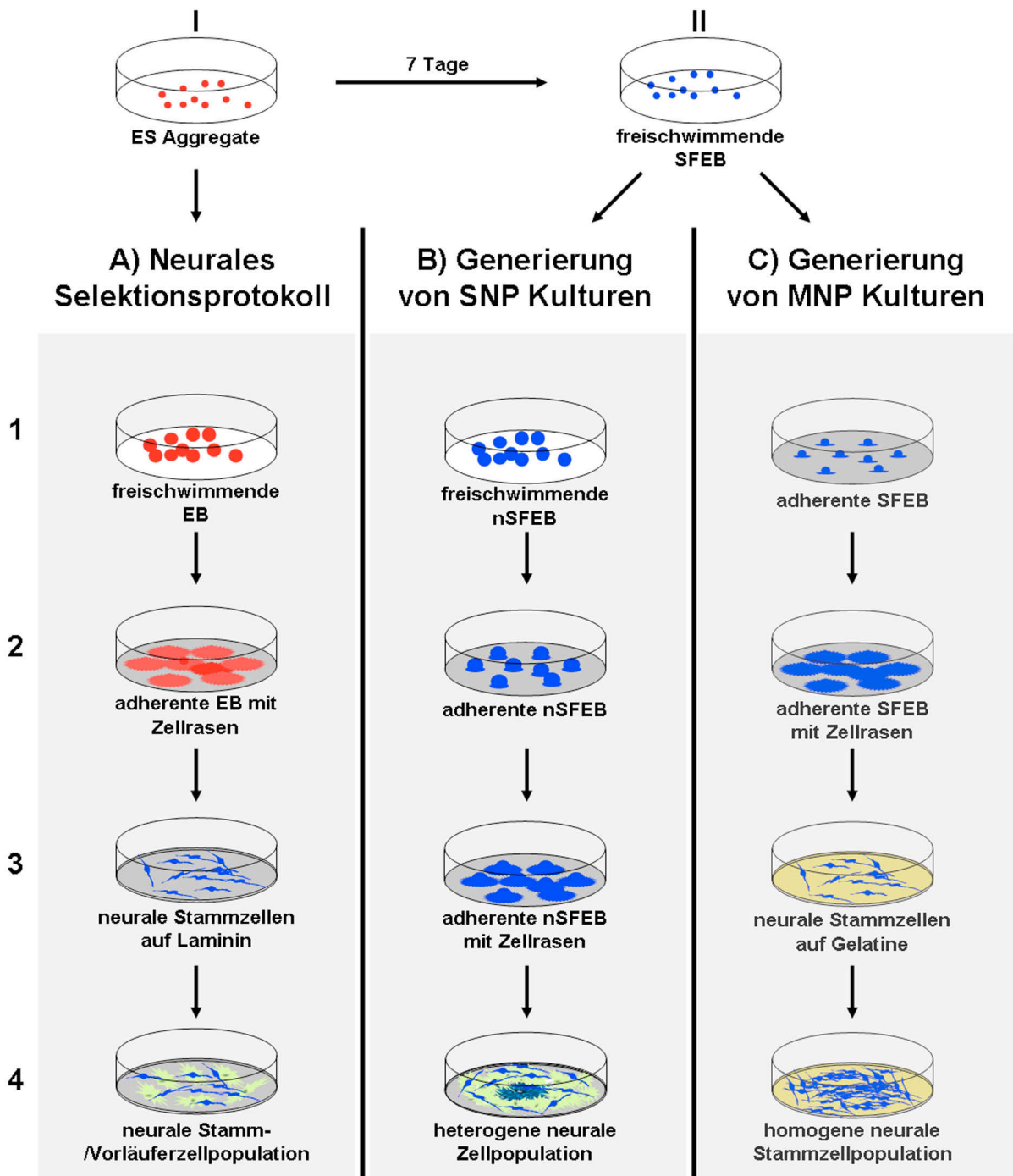
---

<sup>5</sup> Induktion ist ein Entwicklungsprozess, bei dem das Differenzierungspotenzial einer Zelle durch die Einwirkung von externen Faktoren verändert wird.

<sup>6</sup> Oct-4 ist ein Protein, welches nur in pluripotenten Stammzellen nachgewiesen werden kann.

war die Grundlage zur Durchführung eines weiteren Schrittes, mit der Absicht neurale Zellen zu generieren, bei denen die Ausbildung nicht-neuraler Zellen nahezu vollständig ausbleibt. Hierzu wurde die Zellpopulation, welche innerhalb der ersten fünf Tage aus den nSFEB heraus migriert war (Abb. 3c, 2, 3), selektiv geerntet und kultiviert. Aufgrund der Durchführung dieses sekundären Aufreinigungsschrittes, wurde diese neurale Zellpopulation als SNP bezeichnet (Abb. 3c, 4). Innerhalb des Zellrasens von SNP-Kulturen bildeten sich multizelluläre Strukturen mit einem zentralen Lumen aus, die oben erwähnten neuralen Rosetten, welche sich vorwiegend aus neuroepithelialen Zellen zusammensetzten und das *In-vitro*-Pendant des Neuralrohrs darstellen (Abb. 3c, 4). Diese SNP-Kulturen zeigten keine Hinweise mehr auf nicht-neurale Zellen, da sich zum einen keine Oct-4-positiven restlichen ES Zellen immunzytochemisch nachweisen ließen und zum anderen die Ausbildung von endothelähnlichen Zellen oder kontraktilen Muskelzellen aus Langzeit-Kulturen nicht beobachten ließ (Illes et al., 2009).

Zur Generierung von MNP-Kulturen (Abb. 3c) werden SFEB auf beschichteten Platten kultiviert, was zur Folge hat, dass nach Anhaften der SFEB-Aggregate, ähnlich wie oben beschrieben, Zellen innerhalb von drei bis fünf Tagen aus dem SFEB-Aggregat heraus migrieren (Abb. 3c, 1 + 2). Diese Zellpopulation wird dann nach Abtrennung der SFEB-Aggregate selektiv geerntet und auf Gelatine-beschichteten Platten kultiviert bzw. angereichert (Abb. 3c, 3 + 4). Hierdurch entstehen Zellpopulationen, die größtenteils aus neuralen Stammzellen bestehen. Conti und Kollegen (2005) konnten zeigen, dass eine geringe Zelldichte, das Substrat Gelatine und die Wachstumsfaktoren EGF und FGF-2 die Proliferation dieser neuralen Stammzellen ermöglichen und sich dadurch, nach mehrmaligem Passagieren der Zellen, eine reine neurale multipotente Stammzellpopulation gewinnen lässt. Diese Zellen weisen Eigenschaften radialer Gliazellen auf und behalten nach mehreren Passagen ihre Fähigkeit zur Bildung von Neuronen und reifen Gliazellen (Abb. 3c, 4). Im Gegensatz zum klassischen Neurosphenen-Assay, erfolgt die Anreicherung dieser neuralen Zellen außerhalb einer Nische, wobei ihre Proliferations- und Differenzierungseigenschaften auch über viele Passagen hinweg stabil bleiben und daher von Conti und Kollegen als „Niche-independent Neural Stem Cells“ bezeichnet wurden (Conti et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit werden diese Zellen als MNP bezeichnet (Abb. 3b, 4).



*Abb. 3: Schematische Darstellung neuraler Differenzierungsprozeduren an embryonalen Stammzellen. Für eine detaillierte Beschreibung siehe Abschnitt 4.1*



---

## 4.2 Entwicklung ES Zell-abgeleiteter neuronaler Netzwerke *in vitro*

---

### **Development and pharmacological modulation of embryonic stem cell-derived neuronal network activity.**

Sebastian Illes, Wiebke Fleischer, Mario Siebler, Hans-Peter Hartung, Marcel Dihné

*Experimental Neurology*, 2007, July, 207 171–176

### 4.2.1 Ergebnisse

#### **ES Zell-abgeleitete neurale Zellen bilden synchron aktive neuronale Netzwerke**

In einem ersten Teil der Arbeit wurde untersucht, ob sich die ES Zell-abgeleiteten neuronalen Zellen *in vitro* soweit selbst organisieren können, dass es zur Ausbildung eines funktionellen neuronalen Netzwerkes kommt. Die hier verwendeten ES Zell-abgeleiteten neuronalen Populationen wurden durch das Selektionsprotokoll generiert. Die hieraus entstandenen neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen wurden dann auf MEAs kultiviert und durch die Zugabe des Wachstumsfaktor FGF-2 die Proliferation dieser Zellen solange aufrechterhalten, bis sich eine dichte Zellpopulation gebildet hatte. Nach dem Entzug von FGF-2 kam es zur terminalen Differenzierung der neuronalen Zellen, deren elektrophysiologische Reifung alle zwei bis drei Tage mittels MEA-Messungen bestimmt wurde.

Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass sich innerhalb der ersten 14 Tage nach Entzug des Wachstumsfaktors FGF-2 erste spontanaktive und unkorrelierte Spikes an einigen Elektroden detektieren lassen. Die Elektroden, die solche Aktivität maßen, werden im Folgenden als „aktive Elektroden“ bezeichnet. Sowohl die Anzahl der Spikes, als auch die Anzahl der aktiven Elektroden nahm innerhalb der folgenden Woche zu. Des Weiteren zeigte sich, dass die Organisation der Spikes sich änderte. So konnten nach drei Wochen sogenannte „Trains of Spikes“ und Bursts beobachten werden. Diese beiden Signalformen sind dadurch charakterisiert, dass die Spikes in einem sehr dichten zeitlichen Intervall auftreten, wobei die Amplitude der Spikes bei den Trains of Spikes gleich bleibt. Im Gegensatz zu den Trains of Spikes sind die Spikes in einem Burst durch kürzere Spikeintervalle und Variation der einzelnen Spikeamplituden charakterisiert. Vier Wochen

nach Entzug von FGF-2 erfolgte neben der Zunahme der Anzahl aktiver Elektroden, Spikes und Bursts auch eine globale Veränderung des Aktivitätsmusters. So konnten zu diesem Zeitpunkt erstmals synchrone Bursts beobachtet werden, die ein oszillierendes Muster bildeten, welches sich über die gesamte neuronale Population hinweg räumlich ausbreitete. Des Weiteren zeigte sich sechs Wochen nach Entzug von FGF-2, dass die Frequenz der synchronen neuronalen Aktivitätsmuster zugenommen hatte.

Neben dieser elektrophysiologischen Entwicklung der neuronalen Zellpopulation, zeigten morphologische und immunzytochemische Analysen zwischen sieben und 28 Tagen nach der Einleitung der terminalen Differenzierung durch den Entzug von FGF-2, dass sich die Anzahl der  $\beta$ -TubulinIII-positiven Neuriten und Synaptophysin-positiven pre-synaptischen Strukturen erhöht hatte und es zur Ausbildung eines dichten Neuritengeflechts auf den MEAs gekommen war.

### **ES Zell-abgeleitete neuronale Netzwerkaktivität wird durch GABAerge und glutamterge Neurone reguliert**

Pharmakologische Untersuchungen belegten eine funktionelle Beteiligung spannungsabhängiger Natriumkanäle sowie von GABA<sub>A</sub>- bzw. NMDA-(N-Methyl-D-Aspartat) Rezeptoren an der Ausbildung der neuronalen Netzwerkaktivität in ES Zell-abgeleiteten neuronalen Kulturen. Dies konnte über die Applikation von Substanzen gezeigt werden, die spezifisch diese Kanäle bzw. Neurotransmitter-Rezeptoren regulieren. So führte die spezifische Blockierung der spannungsabhängigen Natriumkanäle mittels Tetrodotoxin (TTX) zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der neuronalen Aktivität. Die Fähigkeit des NMDA-Rezeptors, den Ionenfluss von zwei- und einwertigen Ionen zu regulieren, ist sowohl von der Bindung des Neurotransmitters Glutamat als auch von der spannungsabhängigen Blockierung der Ionenpore durch Magnesium abhängig. Wird Magnesium dem extrazellulären Raum entzogen, ist die Aktivität des NMDA-Rezeptors von der Spannung unabhängig und ermöglicht bei alleiniger Bindung von Glutamat den Ionenfluss. Durch Austausch des Kulturmediums gegen eine Magnesium-freie Salzlösung, konnte die Ausbildung einer hoch frequenten, synchronen Aktivität beobachtet werden. Die Zugabe von NMDA führte unter Magnesium-freien Bedingungen nicht zu einer erhöhten Aktivierung, sondern zu einer Abnahme der neuronalen Netzwerkaktivität. Diesem Zustand ließ sich durch die Zugabe des spezifischen NMDA-Rezeptor-Antagonisten AP5 (2-Amino-5-phosphonopentansäure) entgegenwirken. Ebenfalls führte die Applikation des inhibitorischen Neurotransmitters GABA zu einer

---

Abnahme der neuronalen Netzwerkaktivität, welche ebenfalls durch einen spezifischen GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Antagonisten, Bicucullin, aufgehoben werden konnte.

#### 4.2.2 Diskussion

In diesem Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass ES Zell-abgeleitete neurale Zellen *in vitro* ein funktionelles neuronales Netzwerk bilden können.

Die Entwicklung eines synchron aktiven neuronalen Netzwerkes vollzieht sich innerhalb von vier bis sechs Wochen und lässt sich in vier Phasen unterteilen. Während der ersten Phase (innerhalb der ersten zwei Wochen nach FGF-2 Entzug) reifen die neuronalen Vorläuferzellen zu Neuronen aus, welche vorerst spontane unkorrelierte Aktionspotenziale erzeugen, die als Spikes mittels des MEA-Systems gemessen werden können. In der zweiten Phase (nach drei Wochen) zeigt sich eine Zunahme der Anzahl spontan aktiver Neurone in Form einer Zunahme der aktiven Elektroden. Des Weiteren lässt sich in diesem Stadium eine Organisation der Spikes in Trains of Spikes und Bursts beobachten. Der veränderten Spikeorganisation liegt eine fortschreitende Reifung der einzelnen Neurone zu Grunde, welche schon mittels Patch-Clamp-Messungen an individuellen ES Zell-abgeleiteten Neuronen *in vitro* und nach Transplantation *in vivo* beobachtet werden konnte (Lang et al., 2004; Wernig et al., 2004; Buhmann et al., 2006). In der dritten Phase (nach vier Wochen) lassen sich synchrone Aktivitätsmuster beobachten, die sich räumlich über die ganze neuronale Zellpopulation ausbreiten. Die zeitgleiche Messung synchroner neuronaler Aktivitätsmuster an verschiedenen Elektroden innerhalb der ES Zell-abgeleiteten neuronalen Population ist ein direkter Beweis, dass eine funktionelle Kommunikation zwischen Neuronen *in vitro* stattfindet. Die Frequenz solcher synchronen neuronalen Aktivitätsmuster und die Anzahl der Spikes, die in einem Burst organisiert sind, nehmen in der vierten Phase (ab der vierten Woche) zu. Diese Veränderungen deuteten somit auf eine noch relativ spät nach Einleitung der terminalen Differenzierung stattfindende funktionelle Plastizität der neuronalen Population hin. Ähnliche Resultate ergaben sich in einer von Ban und Kollegen (Ban et al., 2007) veröffentlichten Arbeit, in welcher die Entwicklung ES Zell-abgeleiteter neuronaler Netzwerke ebenfalls in verschiedene Stadien eingeteilt werden konnte. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen zudem, dass die neuronale Netzwerkaktivität sowohl durch glutamaterge wie auch GABAerge Neurone reguliert wird.

Sowohl die Kinetik der funktionellen Entwicklung als auch die pharmakologische Modulierbarkeit ES Zell-abgeleiteter neuronaler Netzwerke ist mit denen von primären

neuronaler Netzwerken vergleichbar (Giugliano et al., 2004; Arnold et al., 2005; Chiappalone et al., 2006; Fleischer, 2006).

### **4.3 Eigenschaften neuronaler Netzwerke in Abhängigkeit unterschiedlicher Differenzierungsprotokolle für ES Zellen**

---

#### **Niche-dependent development of functional neuronal networks from embryonic stem cell-derived neural populations.**

Sebastian Illes, Stephan Theiss, Hans-Peter Hartung, Mario Siebler and Marcel Dihné

*BMC Neuroscience*, online 2009, August (in press)

#### **4.3.1 Einleitung**

In diesem Teil der Arbeit sollte untersucht werden, wie sich die bisher bekannten neuronalen Differenzierungsprozeduren von embryonalen Stammzellen optimieren lassen. Das neurale Selektionsprotokoll weist zwei Eigenschaften auf, welche die standardisierte Generierung neuronaler Netzwerke erschwert. Zum einen verlieren diese neuronalen Stamm- bzw. Vorläuferzellen nach mehreren Passagen ihr Potenzial zur Ausbildung von Neuronen und differenzieren progressiv in eine gliale Zellpopulation. Des Weiteren variiert die Reinheit und damit die Qualität der neuronalen Kulturen, welche durch neurale Selektion gewonnen wurden, da häufig neben den neuronalen, auch nicht-neuronale Zellen beobachtet wurden. Dabei handelt es sich oftmals um endothelähnliche Zellen, welche die Kultur überwachsen oder um kontraktile Muskelzellen, welche die elektrophysiologischen Messungen beeinflussen.

Somit wurde untersucht, ob sich mittels der in Abschnitt 4.1 beschriebenen neuronalen Induktionsprotokolle zur Generierung von SFEB, SNP oder adhärent wachsender neuronaler Stammzellen – die MNP – eine Optimierung hinsichtlich Standardisierung und Reinheit erzielen lässt.

#### **4.3.2 Ergebnisse**

##### **Fähigkeit zur Ausbildung funktioneller neuronaler Netzwerke aus ES Zell-abgeleiteten nSFEB-, SNP- oder MNP-Kulturen**

Um zu überprüfen ob nSFEB-, SNP- oder MNP-Kulturen neuronale Netzwerke bilden können, wurden sie in getrennten Ansätzen auf MEAs kultiviert. Zur morphologischen und immunzytochemischen Analyse wurden die Kulturen parallel dazu in einem weiteren

---

Ansatz prozessiert. Auch hier erfolgte zuerst eine Proliferationsphase, dann eine durch Wachstumsfaktorentzug induzierte Differenzierungsphase. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass die nSFEB- und SNP-Kulturen schon während der Proliferationsphase nicht nur aus unreifen neuralen Stamm- oder Vorläuferzellen bestehen sondern schon spontan, also noch unter dem Einfluss der Wachstumsfaktoren, reife Zellen wie Astrozyten oder Neurone beinhalten. In den SNP-Kulturen konnte zudem beobachtet werden, dass sich spezifische Nestin-positive Zellen zu neuralen Rosetten organisieren, aus denen sich später größere zelluläre Aggregate, im Folgenden als SNP-Aggregate bezeichnet, entwickelten. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass unreife neurale Zellen vornehmlich im Zentrum der nSFEB- bzw. SNP-Aggregate zu detektieren waren, während sich reife neurale Zellen am Rande der Aggregate befanden. Auch in dem flachen Zellrasen zwischen den drei-dimensionalen Aggregaten konnten, noch unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren, reife neurale Zellen detektiert werden. Zudem ließen sich in den SNP-Kulturen keine Oct-4-positiven Zellen mehr nachweisen, was jedoch innerhalb der Vorstadien dieser Kulturen, den nSFEB, noch der Fall war. Somit stellen die SNP-Kulturen gewissermaßen eine reinere Population dar als die nSFEB-Kulturen. Sowohl für SNP wie auch für nSFEB konnte gezeigt werden, dass sie in der Lage sind innerhalb von zwei Wochen ein synchron aktives neuronales Netzwerk *in vitro* zu bilden. Allerdings wurden neben Kulturen, die synchrone Burstaktivität aufwiesen, auch Kulturen beobachtet, die zwar dichte Burstmuster zeigten, aber keine synchrone Aktivität. Dies zeigte sich sowohl für nSFEB- als auch für SNP-Kulturen. Um zu überprüfen, ob es in nicht synchron aktiven neuronalen Populationen zu einer tonischen De-Synchronisation durch GABAerge Neurone kommt, wie es für primäre hippocampale und striatale Netzwerke beschrieben ist (Arnold et al., 2005; Fleischer, 2006), wurde der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor mittels Antagonist inhibiert. Hierunter kam es zur Bildung synchroner Bursts, so dass angenommen werden kann, dass auch diese Populationen morphologisch und funktionell mit einander vernetzt sind, deren synchrone Netzwerkaktivität aber durch die spontan überwiegende Aktivität GABAerger Interneurone inhibiert wird.

Im Gegensatz hierzu konnte gezeigt werden, dass MNP-Kulturen, welche ursprünglich aus homogenen neuralen Stammzellen bestanden, sich zwar ebenfalls in Neurone differenzierten, aber funktionell lediglich in der Lage waren innerhalb von 7 bis 14 Tagen spontane Spikes zu generieren. Synchrone Aktivitätsmuster oder zumindest nicht synchrone Bursts, konnten in MNP-Kulturen nicht detektiert werden. Auch eine Hemmung der GABAergen Transmission konnte in MNP-Kulturen keine synchrone

Netzwerkaktivität erzeugen. Um zu überprüfen, ob die MNP-Kulturen unter anderen Kulturbedingungen funktionelle neuronale Netzwerke bildeten, wurden verschiedenste Medien, Medienzusätze und neurotrophe Faktoren getestet, welche allesamt jedoch nicht in der Lage waren, MNP-Kulturen in einen synchron aktiven Zustand zu versetzen.

### **Eigenschaften von SNP- und MNP-Kulturen**

Eine Voraussetzung zur Ausbildung funktioneller neuronaler Netzwerkaktivität ist die Anwesenheit einer adäquaten Anzahl von Gliazellen, insbesondere der Astrozyten (Slezak and Pfrieder, 2003). Jedoch zeigte die immunozytochemische Bestimmung der Anzahl von Astrozyten und Oligodendrozyten innerhalb der SNP- und MNP-Kulturen keine Unterschiede zwischen diesen beiden neuronalen Zellpopulationen. Des Weiteren zeigte auch die immunozytochemische Bestimmung der Anzahl der Neurone keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Kulturen. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass das Fehlen einer adäquaten Anzahl an Astrozyten, Oligodendrozyten oder Neuronen nicht verantwortlich ist für die funktionellen Defizite MNP-abgeleiteter neuronaler Populationen. Weiterhin konnten auch keine wesentlichen Unterschiede in den Anteilen GABAerger und glutamaterger Neuronen der SNP- und MNP-Kulturen gefunden werden, so dass z.B. ein schlichtes Überwiegen GABAerger Neurone als Ursache für die fehlende funktionelle Netzwerkaktivität auch ausschied. Es konnte aber gezeigt werden, dass sich die subzelluläre Verteilung des vGlut2 (vesikulären Glutamattransporter 2)-Proteins in SNP- bzw. MNP-abgeleiteten glutamatergen Neuronen von einander unterscheidet. Das vGlut2-Protein ist in reifen glutamatergen Neuronen innerhalb der Pre-Synapse angereichert und dient dort als Vesikelprotein zur Endozytose von mit Glutamat beladenden Vesikeln, während in jungen glutamatergen Neuronen dieses Protein im Zytoplasma verteilt ist (Real et al., 2006). Das vGlut2-Protein ist in SNP-Kulturen, reifen Neuronen entsprechend, punktförmig entlang von  $\beta$ -TubulinIII<sup>+</sup>-Neuriten lokalisiert war, hingegen zeigten MNP-Kulturen eine zytoplasmatische Verteilung des vGlut2-Proteins innerhalb  $\beta$ -TubulinIII<sup>+</sup>-Neurone, was einem unreifen neuronalen Phänotyp entspricht. Zusätzlich wiesen die SNP-Neurone Neuriten von teilweise mehreren hundert Mikrometern Länge auf, während MNP-abgeleitete Neurone nur kurze Neuriten ausbildeten.

### 4.3.3 Diskussion

#### Homogenität auf Kosten der terminalen neuronalen Differenzierung und Funktion

In diesem Teil der Arbeit sollte untersucht werden, wie sich die neuronalen *In-vitro*-Differenzierungsprozeduren von embryonalen Stammzellen optimieren lassen. Zu diesem Zweck wurden drei ES Zell-abgeleitete neurale Zellpopulationen generiert: nSFEB, SNP und MNP. Es sollte zum einen ausgeschlossen werden, dass die ES Zell-abgeleiteten neuronalen Zellpopulationen restliche ES Zellen beinhalten und zum anderen, dass es zur Bildung von nicht-neuronalen Zellen wie endothelähnlichen Zellen oder Muskelzellen kommt. Es konnte gezeigt werden, dass diese Anforderungen nur die SNP- und MNP-Kulturen erfüllen.

Wie zuvor von Conti und Kollegen (2005) erstmals beschrieben, zeigt auch diese Arbeit, dass es möglich ist, aus ES Zellen eine reine Zellpopulation aus radialen Gliazellen, also neuronalen Stammzellen, zu generieren, die auch nach einer Vielzahl von Passagen multipotente Eigenschaften zur Ausbildung von Neuronen und Gliazellen aufweist. Damit stellen die MNP-Kulturen eine homogene neurale Zellpopulation dar, deren Fähigkeit zur Ausbildung eines neuronalen Netzwerkes in dieser Arbeit erstmals untersucht wurde.

Es konnte gezeigt werden, dass diese neuronalen Stammzellpopulationen nicht in der Lage sind, *in vitro*, ein funktionell miteinander kommunizierendes neuronales Netzwerk zu bilden, während die SNP-Kulturen diese Fähigkeit aufweisen. Im Unterschied zu den MNP-Kulturen setzen sich die SNP-Kulturen aus verschiedenen unreifen und reifen neuronalen Zellen zusammen und stellen somit eine heterogene neurale Zellpopulation dar. Heterogen bedeutet hier zwar das Vorkommen verschiedener neuronaler Zellen, es sei aber darauf hingewiesen, dass sowohl die SNP- als auch die MNP-Kulturen keine restlichen Oct-4-positiven Zellen beinhalten. Es konnten anhand eines morphologischen und immunzytochemischen Vergleichs differenzierter MNP- und SNP-Kulturen Hinweise erbracht werden, dass Neurone in einer heterogenen Zellpopulation terminal ausdifferenzieren. Im Gegensatz hierzu weisen Neurone der differenzierten MNP-Kulturen ein vermindertes Neuritenwachstum sowie eine beeinträchtigte Synaptogenese auf. Dies weist insgesamt auf eine verminderte Ausreifung der MNP-abgeleiteten Neuronen hin, trotz einer adäquaten Differenzierungsphase. Diese Daten werden untermauert durch die Arbeit von Conti und Kollegen (2005) in der beschrieben wurde, dass sich nur vereinzelt Synaptophysin-positive Strukturen ausbilden. Darüber hinaus konnten sie mittels Patch-



---

Clamp-Messungen an diesen Neuronen zeigen, dass sich *in vitro* erst nach einer 30-tägigen Differenzierung einzelne Aktionspotentiale evozieren lassen. Im Gegensatz dazu belegt die vorliegende Arbeit, dass Neurone in den heterogenen SNP-Kulturen schon innerhalb einer Woche terminal ausreifen können und funktionell aktiv sind. Patch-Clamp-Messungen an Neuronen, die mittels Aggregat-basierter Differenzierungs-Protokolle ausgereift sind, zeigen darüber hinaus, dass schon wenige Tage nach Beginn der Differenzierung Aktionspotenziale detektiert werden können (Bain et al., 1995; Bibel et al., 2004). Bei diesen Protokollen erfolgte die terminale Differenzierung der neuronalen Vorläuferzellen ebenfalls in einer zellulären Umgebung aus unreifen und reifen neuronalen Zellen. Als mögliche Ursache für die beschleunigte Ausreifung der Neurone lässt sich ein astroglialer Einfluss vermuten. In diesem Zusammenhang konnte anhand von humanen ES Zell-abgeleiteten neuronalen Stammzellen gezeigt werden, dass diese größtenteils auch eine zytoplasmatische Verteilung von Synapsen-assoziierten Proteinen und eine verlangsamte neuronale Ausreifung aufweisen, wenn sie zum Zeitpunkt der Initiierung der Differenzierung nicht mit Astrozyten ko-kultiviert werden (Johnson et al., 2007). Des Weiteren zeigt ein Vergleich der elektrophysiologischen Daten die mittels der Patch-Clamp-Methode erhoben wurden, dass sich ebenfalls humane ES Zell-abgeleitete heterogene (Okuno et al., 2009) und homogene neurale Stammzellpopulationen (Koch et al., 2009) hinsichtlich der Geschwindigkeit der funktionellen neuronalen Differenzierung unterscheiden. So zeigte Koch und Kollegen (2009) an einer humanen, homogenen neuronalen Stammzellpopulation, dass diese Neuronen erst acht Wochen nach Initiierung der Differenzierung durch Entzug von Wachstumsfaktoren Aktionspotenziale aufweisen. Im Gegensatz dazu zeigten Okano und Kollegen (2009) anhand von humanen heterogenen neuronalen Kulturen, dass sich bereits innerhalb von vier Wochen nach Entzug von Wachstumsfaktoren vergleichbare Aktionspotenziale ableiten lassen.

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse lassen daher vermuten, dass die heterogenen neuronalen Zellpopulationen die terminale neuronale Differenzierung sowie die Ausbildung eines funktionellen neuronalen Netzwerkes begünstigen.

### **Vergleich von humanen und murinen ES Zell-abgeleiteten neuronalen Netzwerken**

Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass bei der Anwendung des nSFEB-Protokolls an humanen embryonalen Stammzellen diese ebenso in der Lage sind, ein funktionelles neuronales Netzwerk *in vitro* zu generieren (Heikkila et al., 2009). Zudem werden bei

humanen neuronalen Populationen ähnliche elektrophysiologische Entwicklungsstadien durchlaufen wie bei murinen Populationen (Illes et al., 2007; Heikkila et al., 2009; Illes et al., 2009). Ein Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den Ergebnissen von Heikkila und Kollegen (2009) erlaubt es erstmals eine Aussage darüber zu machen, ob der zeitliche Verlauf der Entwicklung funktioneller neuronaler Netzwerke sich zwischen diesen beiden Spezies unterscheidet. Sowohl humane als auch murine ES Zell-abgeleitete Neurone bilden innerhalb von vier bis sechs, teilweise aber auch schon nach zwei Wochen synchrone Aktivität aus (Heikkila et al., 2009; Illes et al., 2009). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Ausbildung funktioneller neuronaler Strukturen, zumindest *in vitro*, in humanen und murinen Systemen einen ähnlichen zeitlichen Rahmen aufweist.

---

#### **4.4 Einfluss von Liquor cerebrospinalis von Schädel-Hirn-Trauma-Patienten auf die neuronale Netzwerkaktivität von ES Zell-abgeleiteten neuronalen Netzwerken.**

---

##### **Cerebrospinal fluid of brain trauma patients inhibits neuronal network function.**

Frauke Otto\*, Sebastian Illes\*, Jessica Opatz, Maurice Laryea, Stephan Theiss, Hans-Peter Hartung, Alfons Schnitzler, Mario Siebler\*\* and Marcel Dihné\*\*

\* F.O. and S.I. contributed equally to this work. \*\*M.S. and M.D. share senior authorship.

*Annals of Neurology*, 2009, (in press)

##### **4.4.1 Einleitung**

Patienten, die ein Schädel-Hirn-Trauma (SHT) erlitten haben, weisen oftmals kognitive und neuropsychologische Störungen auf, deren Grad sich mittels klinisch-neurologischer Tests bestimmen lässt. Die beobachtete Beeinträchtigung der globalen Gehirnaktivität kann häufig nicht allein durch die SHT-vermittelte primäre Verletzung und die daraus resultierende fokale funktionelle Schädigung erklärt werden. Es wird daher vermutet, dass sekundäre pathophysiologische Prozesse eine Rolle spielen. So konnten z.B. erhöhte Konzentrationen exzitatorischer Aminosäuren (EAS) wie Glutamat im Liquor cerebrospinalis (LCS oder abgekürzt Liquores) von SHT Patienten gefunden werden, die möglicherweise für eine Ausbreitung des primären läsionsbedingten Schadens mit verantwortlich sind (Chiang et al., 2006; Nilsson et al., 2006; Toczyłowska et al., 2006). Inwieweit Veränderungen der Zusammensetzung von Liquores die Hirnaktivität modulieren können, ist völlig unklar. Gerade unter pathologischen Bedingungen bei gestörter Blut-Hirn-Schranke kann die Zusammensetzung des extrazellulären Raums bzw. der interstitiellen Flüssigkeit, welche die Neurone umgibt, auch durch Veränderungen der Liquores beeinflusst werden. Funktionelle Konsequenzen pathologisch veränderter Liquores bei SHT Patienten konnten jedoch bisher nicht direkt nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde versucht, die Wirkung physiologischer oder pathologischer (nach SHT) Liquores auf neuronale Netzwerkaktivität zu überprüfen.

#### 4.4.2 Ergebnisse

##### **Humane Liquor-cerebrospinalis-Proben beeinflussen die neuronale Netzwerkaktivität**

Um die Wirkung humaner Liquores auf neuronale Netzwerkaktivität zu messen, wurden zunächst Kontroll-Liquores von Patienten entnommen, welche eine unauffällige Zusammensetzung bzw. keine akut neurologischen Erkrankungen aufwiesen. Diese humanen Kontroll-Liquores wurden in ihrer Wirkung mit einer Salzlösung verglichen, die lediglich physiologische Konzentrationen von Natrium, Kalium, Kalzium und Magnesium enthielt und im folgenden als artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit (aCSF) bezeichnet wird. Humane Kontroll-Liquores führten im Vergleich zu aCSF zu einer Zunahme der neuronalen Netzwerkaktivität sowohl bei primären, als auch bei ES Zell-abgeleiteten Kulturen. Auffällig war, dass Kappa, ein Parameter zur Beschreibung der synchronen neuronalen Aktivität, nur bei ES Zell-abgeleiteten Netzwerken signifikant erhöht war, während die globalen neuronalen Aktivitätsparameter, wie Spikes pro Minute, Bursts pro Minute und der prozentuale Anteil der Spikes in Bursts, auch bei primären Kulturen eine Erhöhung aufwiesen.

Es wurden dann Liquores von Patienten mit schwerem SHT entnommen, welche im Folgenden als pathologisch veränderte Liquores von SHT-Patienten (Trauma-Liquores) bezeichnet werden. Diese Patienten zeigten fast ausnahmslos erhebliche Bewusstseinsstörungen, die sich in deutlich reduzierten Werten der Glasgow-Coma-Skala niederschlugen. Biochemische Untersuchungen der Trauma-Liquores ergaben folgende Auffälligkeiten: i. Eine erhöhte Konzentration an Gesamt-Protein und Lactat. ii. Eine teilweise erhöhte Zellzahl. iii. Eine erhöhte Konzentration von exzitatorischen Aminosäuren, insbesondere von Glycin, Serin, Alanin oder teilweise auch von Glutamat sowie Methionin. Um die erhöhte Zellzahl der Trauma-Liquores zu eliminieren, wurden alle Proben abzentrifugiert. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Applikation der Trauma-Liquores zu einer deutlichen Reduktion allgemeiner Aktivitätsparameter sowie auch der synchronen Netzwerkaktivität führt.

---

**Niedermolekulare Substanzen in Trauma-Liquores induzieren eine NMDA-Rezeptor-abhängige Überstimulation der neuronalen Netzwerke**

Um festzustellen, welche Molekülgruppe für diesen neuronalen Aktivitätszusammenbruch verantwortlich ist, wurden aus den Trauma-Liquorproben zwei Fraktionen erstellt, welche entweder kleine Moleküle (<3,5 kDA) oder große Moleküle (>1 kDA) enthielten. Nach Applikation dieser beiden unterschiedlichen Fraktionen zeigte sich, dass nur die Trauma-Liquor Fraktionen, welche ausschließlich niedermolekulare Moleküle enthielten (im Folgenden als tLCS-low bezeichnet), die Netzwerksuppression vermittelten, während die Trauma-Liquorfraktionen, die ausschließlich hochmolekulare Moleküle enthielten (im Folgenden als tLCS-high bezeichnet), keinen Einfluss auf die neuronale Aktivität hatten. Chemische Analysen zeigten, dass beide Fraktionen die gleiche Ionenkonzentration aufwiesen, sich jedoch hinsichtlich der Konzentration von Gesamtprotein und Aminosäuren unterschieden. So ließen sich in den tLCS-low Fraktionen eine geringe Konzentration an Gesamtprotein, aber eine hohe Konzentration von Aminosäuren nachweisen. Im Gegensatz dazu enthielten die tLCS-high Fraktionen höhere Konzentrationen an Gesamtprotein, aber eine kaum nachweisbare Konzentration an Aminosäuren. Eine detaillierte Analyse der chemischen Zusammensetzung der tCSF-low Fraktionen zeigte, dass insbesondere die exzitatorischen Aminosäuren Glycin, Alanin, Serin und Glutamat erhöht waren, wobei letztere nur in zwei von zwölf Trauma-Liquorproben erhöht war.

Es ist bekannt, dass diese Aminosäuren als Agonisten des NMDA-Rezeptors wirken und somit als exzitatorische Aminosäuren Einfluss auf die neuronale Erregbarkeit haben können. Um zu überprüfen, welche Wirkung die Aktivierung des NMDA-Rezeptors auf die neuronale Netzwerkaktivität hat, wurden verschiedene Konzentrationen von NMDA auf neuronale Netzwerke appliziert. So kam es ab einem bestimmten Schwellenwert zu einem Zusammenbruch der neuronalen Netzwerkaktivität, welcher sich durch Zugabe des NMDA-Rezeptor-Antagonisten AP5 kompensieren ließ.

Daher wurde untersucht ob die Zugabe von AP5 auch dem tCSF-vermittelten neuronalen Netzwerkzusammenbruch entgegenwirken kann. In der Tat zeigte sich, dass AP5 den neuronalen Netzwerkzusammenbruch signifikant verringerte.

**Experimenteller Beitrag der Erstautoren zu der Publikation:**

Sebastian Illes	<p><b>Techniken:</b></p> <p>Generierung und Kultivierung von ES Zell-abgeleiteten neuronalen Netzwerken.</p> <p>Fraktionierung der Trauma-Liquorproben.</p> <p><b>Ergebnisse:</b></p> <p>Morphologische und immunzytochemische Aufnahmen ES Zell-abgeleiteter neuronaler Netzwerke (Abb.1 a).</p> <p>Auswertung der chemischen Analysen der un- und fraktionierten Trauma-Liquorproben (Abb. 4 a).</p> <p>Messung der fraktionierten Trauma-Liquorproben auf den neuronalen Netzwerken und Auswertung der MEA-Daten (Abb. 4 b).</p>
Frauke Otto	<p><b>Techniken:</b></p> <p>Generierung und Kultivierung von primären kortikalen neuronalen Netzwerken.</p> <p><b>Ergebnisse:</b></p> <p>Auswertung der chemischen Analysen der Liquorproben (Tabelle 1).</p> <p>Medizinische Begutachtung der Patientenakten (Tabelle 2).</p> <p>Messung der unfraktionierten Liquorproben auf neuronalen Netzwerken (Abb. 2).</p> <p>Pharmakologische Modulation neuronaler Netzwerkaktivität (Abb. 3).</p>

**4.4.3 Diskussion**

In diesem Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich ES Zell-abgeleitete neuronale Kulturen verwenden lassen, um funktionelle Auswirkungen humaner Liquores auf neuronale Netzwerke zu charakterisieren. Es konnte erstens gezeigt werden, dass biochemisch unauffällige Liquores einer Kontrollgruppe die Netzwerkaktivität im Vergleich zu einfachen definierten Salzlösungen verstärken. So kommt es sowohl bei den primären kortikalen Neuronen, sowie bei ES Zell-abgeleiteten neuronalen Netzwerken zu einer Erhöhung der globalen Aktivität. Bei ES Zell-abgeleiteten Kulturen kommt es zusätzlich zu einer Erhöhung der Synchronizität. Funktionell ähnlich aktive neuronale

Netzwerke können auch in Magnesium-freier Salzlösung oder nach Inhibition GABAerger Transmission beobachtet werden (siehe Publikation 1 bzw. 2). Da die chemischen Analysen zeigen, dass es zwischen den verwendeten Kontroll-Liquores, Trauma-Liquores und definierten Salzlösungen hinsichtlich der Magnesium-Konzentration keine signifikanten Unterschiede gibt, ist die Magnesiumkonzentration nicht verantwortlich für diesen Effekt. Es ist daher anzunehmen, dass es zu einer Inhibition der GABAergen Transmission kommt. Jedoch bedarf es weiterer Untersuchungen, um diese Hypothese zu bestätigen.

Wir konnten zweitens zeigen, dass die Applikation von Trauma-Liquores zu einer Reduktion der globalen Aktivität und der Synchronizität sowohl in primären, als auch in ES Zell-abgeleiteten neuronalen Netzwerken führt. Diese Reaktion ist vergleichbar mit der NMDA-vermittelten Reduktion der neuronalen Netzwerkaktivität.

In diesem Zusammenhang sei kurz erläutert, dass eine hohe Konzentration von NMDA-Rezeptor-Agonisten den Ionenfluss durch den NMDA-Rezeptor in einer spannungs- und ligandenbindungs-unabhängigen Weise ermöglicht. Demzufolge resultiert der Agonist-vermittelte Natrium-Influx und Kalium-Efflux durch den NMDA-Rezeptor in einer Depolarisation des Neurons, welche ab einer bestimmten Schwellenkonzentration des Agonisten ausgelöst wird. Die daraus resultierende permanente Depolarisation verhindert die Ausbildung von Aktionspotenzialen und letztendlich auch die Neurotransmitterausschüttung, was sich auf neuronaler Netzwerkebene in Form eines Zusammenbruchs der neuronalen Netzwerkaktivität darstellt.

Die Ergebnisse der Fraktionierung der Trauma-Liquorproben zeigen, dass niedermolekulare Substanzen für diese Suppression verantwortlich sind. Weiterhin zeigen chemische Analysen, dass eben diese Fraktionen erhöhte Konzentrationen exzitatorischer Aminosäuren wie Glycin, Alanin, Serin und teilweise auch Glutamat aufweisen. Diese fungieren u. a. als NMDA-Rezeptor-Agonisten, wodurch es nahe liegend ist, dass die Trauma-Liquor-vermittelte neuronale Netzwerksuppression über eine Interaktion der exzitatorischen Aminosäuren mit dem NMDA-Rezeptor zustande kommt. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Trauma-Liquor-vermittelte Netzwerksuppression durch die Applikation spezifischer NMDA-Rezeptor-Antagonisten kompensiert werden kann.

Zusammenfassend lässt sich daher vermuten, dass die SHT-bedingte Konzentrationserhöhung exzitatorisch wirkender Aminosäuren in Liquores eine NMDA-Rezeptor-Überaktivierung verursacht, die eine anhaltende neuronale Depolarisation und

damit eine Netzwerksuppression bewirkt. Jedoch ist in dieser Arbeit die Charakterisierung der niedermolekularen Fraktion der Trauma-Liquorproben noch nicht soweit vorangeschritten, dass die Wirkung möglicherweise noch nicht identifizierter pharmakologisch wirksamer Substanzen vollständig ausgeschlossen werden kann.



## 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ES Zell-abgeleitete neurale Zellen auf Multielektroden-Arrays (MEAs) kultiviert werden können und funktionelle neuronale Netzwerke bilden. Die elektrophysiologische Entwicklung ES Zell-abgeleiteter funktioneller Netzwerke wurde über eine nicht-invasive Messmethode beschrieben und erlaubte die Kategorisierung in vier elektrophysiologische Stadien. Parallele immunzytochemische und pharmakologische Analysen zeigten zum einen, dass die elektrophysiologische Reifung begleitet wird durch Neuritenwachstum und Synaptogenese, und zum anderen, dass die funktionellen neuronalen Populationen vorwiegend aus GABAergen und glutamatergen Neuronen bestehen.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurden optimierte neurale Differenzierungsprozeduren an ES Zellen angewandt, welche es ermöglichten, neurale Kulturen herzustellen, die frei von restlichen ES Zellen sind und daher als reine neurale Kulturen für die Generierung neuronaler Netzwerke genutzt werden konnten. Zum einen konnte eine neurale Kultur gewonnen werden, welche sich aus unreifen, als auch aus reifen neuronalen Zellen zusammensetzte und daher als heterogene neurale Zellpopulation bezeichnet wurde. Zum anderen ließ sich eine Zellpopulation generieren, die ausschließlich aus radialen Gliazell-ähnlichen Stammzellen bestand und daher als eine homogene neurale Zellpopulation angesehen werden konnte. Es zeigte sich aber, dass trotz einer quantitativ ausreichenden neuronalen und glialen Differenzierung, diese homogenen Kulturen keine funktionellen neuronalen Netzwerke *in vitro* bilden können. Demgegenüber erfolgte in den heterogenen neuronalen Kulturen nicht nur eine terminale neuronale Differenzierung, sondern auch die Ausbildung eines funktionellen neuronalen Netzwerkes. Somit zeigte sich, dass die neurale Homogenität ES Zell-abgeleiteter neuraler Stammzellen eine verminderte terminale neuronale Differenzierung und Funktionalität zur Folge hat. Demgegenüber ist eine heterogene neurale Kultur für eine terminale neuronale Reifung, sowie auch der Ausbildung eines funktionellen neuronalen Netzwerkes förderlich. Daher lassen sich ES Zell-abgeleitete heterogene neurale Kultur reproduzierbare für die Generierung von neuronalen Netzwerken nutzen.

In dem dritten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich sowohl primäre als auch ES Zell-abgeleitete neuronale Kulturen verwenden lassen, um die funktionellen

Auswirkungen physiologischer und pathologisch-veränderter humaner Liquores auf neuronale Netzwerke zu charakterisieren. So führte die Applikation physiologisch zusammengesetzter Liquores, welche von Patienten entnommen wurden, die keine akut neurologischen Erkrankungen aufwiesen, zu einer Erhöhung der neuronalen Aktivität und Synchronizität, der wahrscheinlich eine Inhibition GABAerger Transmission zugrunde liegt. Im Gegensatz dazu, erfolgte nach Applikation von pathologisch veränderten Liquores, gewonnen von Schädel-Hirn-Trauma (SHT)-Patienten, ein Zusammenbruch der neuronalen Netzwerkaktivität. Bezüglich der Wirkung pathologischer Liquores auf funktionelle neuronale Netzwerke lassen die Ergebnisse der Fraktionierungen und chemischen Analysen der Liquorproben, so wie auch die, der pharmakologischen Experimente, eine mögliche Schlussfolgerung zu. Dieser zu Folge verursacht eine SHT-bedingte Konzentrationserhöhung exzitatorisch wirkender Aminosäuren in Liquores eine NMDA-Rezeptor Überaktivierung, welche letztendlich zu einer Suppression neuronaler Netzwerkaktivität führt. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass ES Zell-abgeleitete neurale Populationen zum Studium entwicklungsbiologischer, System-neurophysiologischer und auch zur Untersuchung klinischer Fragestellungen geeignet sind und damit ein neues Anwendungsgebiet in der klinischen Neurologie erschließen können.

## 6 Summary

The present work demonstrates that embryonic stem (ES) cell-derived neural cells can be cultivated on multielectrode arrays (MEAs) and give rise to a functional neuronal network *in vitro*. With the help of this non-invasive method, the electrophysiological development could be described and categorized in four distinct developmental stages. The electrophysiological maturation is accompanied by neurite growth and synaptogenesis of the neuronal population, which contains predominantly GABAergic and glutamatergic neurons, demonstrated by pharmacological and immunocytochemical analyses performed in parallel.

A further part of this work introduces different neural differentiation procedures that help obtaining an ES cell-derived neural culture, which is free from residual ES cells and thus represents an optimized and pure neural culture for the generation of functional neuronal networks *in vitro*. On the one hand a neural culture, termed heterogeneous neural cell population, could be generated. This one contained immature and mature neural cells. On the other hand a pure neural stem cell population, termed homogeneous neural cell population, could be generated, comprising only radial glia-like stem cells. In addition, it could be demonstrated, that the homogeneous neural cells give rise to an adequate number of neurons and astrocytes, but these neurons were not able to generate a functional neuronal network, due to an impaired terminal neuronal maturation *in vitro*. In opposite, the heterogeneous neural culture-derived neurons were able to proceed neuronal maturation and generate a functional neuronal network *in vitro*. Thus, homogeneity of ES cell-derived neural stem cells is accompanied by impaired terminal neuronal maturation and impaired neuronal functionality. The present results suggest that neuronal development or maturation in a heterogeneous neural cell population is required for the generation of functional neuronal networks from ES cell-derived neural cells.

The third part of this study describes that both primary and ES cell-derived neuronal cells can be used for characterization of the neuronal network activity after application of physiological or pathologically altered human cerebrospinal fluid (CSF). It could be demonstrated that CSF from healthy patients – who showed no acute neurological diseases – induced an increase of the neuronal activity and synchrony, assumedly due to an inhibition of the GABAergic neurotransmission. In contrast, application of CSF from

patients, who had suffered from a traumatic brain injury, resulted in a decrease of the neuronal activity and a collapse of the synchronous activity. The results of the fractionation and chemical analyses, in combination with pharmacological analyses of CSF probes allowed a possible explanation of the pathological CSF-mediated neuronal network activity collapse. We assume that an increase of the concentration of excitatory amino acids in the CSF, mediated by a traumatic brain injury, could cause an over activation of the NMDA-receptors, which finally leads to a suppression of the neuronal network activity. These results demonstrate direct functional consequences of a pathological alterations of humane CSF on neuronal network activity.

This PhD thesis demonstrates that ES cell-derived neuronal networks can be generated and used to reveal developmental, system-neurophysiological and clinically important issues and therefore represents a new application of embryonic stem cells.

## 7 Literaturverzeichnis

- Angulo MC, Kozlov AS, Charpak S, Audinat E (2004) **Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus.** *J Neurosci* 24:6920-6927.
- Arnhold S, Klein H, Semkova I, Addicks K, Schraermeyer U (2004) **Neurally selected embryonic stem cells induce tumor formation after long-term survival following engraftment into the subretinal space.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:4251-4255.
- Arnold FJ, Hofmann F, Bengtson CP, Wittmann M, Vanhoutte P, Bading H (2005) **Microelectrode array recordings of cultured hippocampal networks reveal a simple model for transcription and protein synthesis-dependent plasticity.** *J Physiol* 564:3-19.
- Aton SJ, Huettner JE, Straume M, Herzog ED (2006) **GABA and Gi/o differentially control circadian rhythms and synchrony in clock neurons.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:19188-19193.
- Ayali A, Fuchs E, Ben-Jacob E, Cohen A (2007) **The function of intersegmental connections in determining temporal characteristics of the spinal cord rhythmic output.** *Neuroscience* 147:236-246.
- Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI (1995) **Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro.** *Dev Biol* 168:342-357.
- Ban J, Bonifazi P, Pinato G, Broccard FD, Studer L, Torre V, Ruaro ME (2007) **Embryonic stem cell-derived neurons form functional networks in vitro.** *Stem Cells* 25:738-749.
- Barberi T, Klivenyi P, Calingasan NY, Lee H, Kawamata H, Loonam K, Perrier AL, Bruses J, Rubio ME, Topf N, Tabar V, Harrison NL, Beal MF, Moore MA, Studer L (2003) **Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice.** *Nat Biotechnol* 21:1200-1207.
- Beggs JM, Plenz D (2004) **Neuronal avalanches are diverse and precise activity patterns that are stable for many hours in cortical slice cultures.** *J Neurosci* 24:5216-5229.
- Bennay M, Langer J, Meier SD, Kafitz KW, Rose CR (2008) **Sodium signals in cerebellar Purkinje neurons and Bergmann glial cells evoked by glutamatergic synaptic transmission.** *Glia* 56:1138-1149.

- Bibel M, Richter J, Schrenk K, Tucker KL, Staiger V, Korte M, Goetz M, Barde YA (2004) **Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage**. *Nat Neurosci* 7:1003-1009.
- Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL (1999) **Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo**. *Science* 283:534-537.
- Bratt-Leal AM, Carpenedo RL, McDevitt TC (2009) **Engineering the embryoid body microenvironment to direct embryonic stem cell differentiation**. *Biotechnol Prog* 25:43-51.
- Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM (2000) **From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice**. *Science* 290:1775-1779.
- Bregman BS, Coumans JV, Dai HN, Kuhn PL, Lynskey J, McAtee M, Sandhu F (2002) **Transplants and neurotrophic factors increase regeneration and recovery of function after spinal cord injury**. *Prog Brain Res* 137:257-273.
- Buhemann C, Scholz A, Bernreuther C, Malik CY, Braun H, Schachner M, Reymann KG, Dihne M (2006) **Neuronal differentiation of transplanted embryonic stem cell-derived precursors in stroke lesions of adult rats**. *Brain* 129:3238-3248.
- Buzsaki G, Draguhn A (2004) **Neuronal oscillations in cortical networks**. *Science* 304:1926-1929.
- Casalbore P, Budoni M, Ricci-Vitiani L, Cenciarelli C, Petrucci G, Milazzo L, Montano N, Tabolacci E, Maira G, Larocca LM, Pallini R (2009) **Tumorigenic potential of olfactory bulb-derived human adult neural stem cells associates with activation of TERT and NOTCH1**. *PLoS One* 4:e4434.
- Chaichana K, Zamora-Berridi G, Camara-Quintana J, Quinones-Hinojosa A (2006) **Neurosphere assays: growth factors and hormone differences in tumor and nontumor studies**. *Stem Cells* 24:2851-2857.
- Chiang MF, Chiu WT, Lin FJ, Thajeb P, Huang CJ, Tsai SH (2006) **Multiparametric analysis of cerebral substrates and nitric oxide delivery in cerebrospinal fluid in patients with intracerebral haemorrhage: correlation with hemodynamics and outcome**. *Acta Neurochir (Wien)* 148:615-621; discussion 621.
- Chiappalone M, Bove M, Vato A, Tedesco M, Martinoia S (2006) **Dissociated cortical networks show spontaneously correlated activity patterns during in vitro development**. *Brain Res* 1093:41-53.
- Conrad S, Renninger M, Hennenlotter J, Wiesner T, Just L, Bonin M, Aicher W, Buhning HJ, Mattheus U, Mack A, Wagner HJ, Minger S, Matzkies M, Reppel M, Hescheler J, Sievert KD, Stenzl A, Skutella T (2008) **Generation of pluripotent stem cells from adult human testis**. *Nature* 456:344-349.
- Conti L, Pollard SM, Gorba T, Reitano E, Toselli M, Biella G, Sun Y, Sanzone S, Ying QL, Cattaneo E, Smith A (2005) **Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell**. *PLoS Biol* 3:e283.

- Darbon P, Tschertner A, Yvon C, Streit J (2003) **Role of the electrogenic Na/K pump in disinhibition-induced bursting in cultured spinal networks.** *J Neurophysiol* 90:3119-3129.
- De Pietri Tonelli D, Pulvers JN, Haffner C, Murchison EP, Hannon GJ, Huttner WB (2008) **miRNAs are essential for survival and differentiation of newborn neurons but not for expansion of neural progenitors during early neurogenesis in the mouse embryonic neocortex.** *Development* 135:3911-3921.
- Eiraku M, Watanabe K, Matsuo-Takasaki M, Kawada M, Yonemura S, Matsumura M, Wataya T, Nishiyama A, Muguruma K, Sasai Y (2008) **Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals.** *Cell Stem Cell* 3:519-532.
- Elkabatz Y, Panagiotakos G, Al Shamy G, Socci ND, Tabar V, Studer L (2008) **Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage.** *Genes Dev* 22:152-165.
- Evans MJ, Kaufman MH (1981) **Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.** *Nature* 292:154-156.
- Fellin T, Halassa MM, Terunuma M, Succol F, Takano H, Frank M, Moss SJ, Haydon PG (2009) **Endogenous nonneuronal modulators of synaptic transmission control cortical slow oscillations in vivo.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:15037-15042.
- Fleischer W (2006) **Entwicklung von striatalen Neuronen zu funktionellen Netzwerken in vitro.** In: Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät. Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität.
- Franceschetti S, Guatteo E, Panzica F, Sancini G, Wanke E, Avanzini G (1995) **Ionic mechanisms underlying burst firing in pyramidal neurons: intracellular study in rat sensorimotor cortex.** *Brain Res* 696:127-139.
- Fromherz P, Stett A (1995) **Silicon-Neuron Junction: Capacitive Stimulation of an Individual Neuron on a Silicon Chip.** *Phys Rev Lett* 75:1670-1673.
- Fromherz P, Offenhausser A, Vetter T, Weis J (1991) **A neuron-silicon junction: a Retzius cell of the leech on an insulated-gate field-effect transistor.** *Science* 252:1290-1293.
- Fuccillo M, Joyner AL, Fishell G (2006) **Morphogen to mitogen: the multiple roles of hedgehog signalling in vertebrate neural development.** *Nat Rev Neurosci* 7:772-783.
- Gaspard N, Gaillard A, Vanderhaeghen P (2009a) **Making cortex in a dish: in vitro corticogenesis from embryonic stem cells.** *Cell Cycle* 8:2491-2496.
- Gaspard N, Bouschet T, Herpoel A, Naeije G, van den Aemele J, Vanderhaeghen P (2009b) **Generation of cortical neurons from mouse embryonic stem cells.** *Nat Protoc* 4:1454-1463.

- Gibson JR, Beierlein M, Connors BW (1999) **Two networks of electrically coupled inhibitory neurons in neocortex.** *Nature* 402:75-79.
- Giugliano M, Darbon P, Arsiero M, Luscher HR, Streit J (2004) **Single-neuron discharge properties and network activity in dissociated cultures of neocortex.** *J Neurophysiol* 92:977-996.
- Glaser T, Perez-Bouza A, Klein K, Brustle O (2005) **Generation of purified oligodendrocyte progenitors from embryonic stem cells.** *Faseb J* 19:112-114.
- Goetz AK, Scheffler B, Chen HX, Wang S, Suslov O, Xiang H, Brustle O, Roper SN, Steindler DA (2006) **Temporally restricted substrate interactions direct fate and specification of neural precursors derived from embryonic stem cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:11063-11068.
- Götz M, Barde YA (2005) **Radial glial cells defined and major intermediates between embryonic stem cells and CNS neurons.** *Neuron* 46:369-372.
- Götz M, Huttner WB (2005) **The cell biology of neurogenesis.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:777-788.
- Greschat S, Schira J, Kury P, Rosenbaum C, de Souza Silva MA, Kogler G, Wernet P, Muller HW (2008) **Unrestricted somatic stem cells from human umbilical cord blood can be differentiated into neurons with a dopaminergic phenotype.** *Stem Cells Dev* 17:221-232.
- Gross GW, Rieske E, Kreutzberg GW, Meyer A (1977) **A new fixed-array multi-microelectrode system designed for long-term monitoring of extracellular single unit neuronal activity in vitro.** *Neurosci Lett* 6:101-105.
- Gross GW, Rhoades BK, Reust DL, Schwalm FU (1993) **Stimulation of monolayer networks in culture through thin-film indium-tin oxide recording electrodes.** *J Neurosci Methods* 50:131-143.
- Guan K, Nayernia K, Maier LS, Wagner S, Dressel R, Lee JH, Nolte J, Wolf F, Li M, Engel W, Hasenfuss G (2006) **Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis.** *Nature* 440:1199-1203.
- Guatteo E, Bacci A, Franceschetti S, Avanzini G, Wanke E (1994) **Neurons dissociated from neocortex fire with 'burst' and 'regular' trains of spikes.** *Neurosci Lett* 175:117-120.
- Heikkila TJ, Yla-Outinen L, Tanskanen JM, Lappalainen RS, Skottman H, Suuronen R, Mikkonen JE, Hyttinen JA, Narkilahti S (2009) **Human embryonic stem cell-derived neuronal cells form spontaneously active neuronal networks in vitro.** *Exp Neurol* 218:109-116.
- Herzog ED (2007) **Neurons and networks in daily rhythms.** *Nat Rev Neurosci* 8:790-802.
- Hescheler J, Fleischmann BK (2001) **Indispensable tools: embryonic stem cells yield insights into the human heart.** *J Clin Invest* 108:363-364.



- Hofmann F, Bading H (2006) **Long term recordings with microelectrode arrays: studies of transcription-dependent neuronal plasticity and axonal regeneration.** J Physiol Paris 99:125-132.
- Hwang YS, Chung BG, Ortmann D, Hattori N, Moeller HC, Khademhosseini A (2009) **Microwell-mediated control of embryoid body size regulates embryonic stem cell fate via differential expression of WNT5a and WNT11.** Proc Natl Acad Sci U S A 106:16978-16983.
- Illes S, Fleischer W, Siebler M, Hartung HP, Dihne M (2007) **Development and pharmacological modulation of embryonic stem cell-derived neuronal network activity.** Exp Neurol 207:171-176.
- Illes S, Theiss S, Hartung H-P, Siebler M, Dihné M (2009) **Niche-dependent development of functional neuronal networks from embryonic stem cell-derived neural populations.** BMC Neurosci.
- Johnson MA, Weick JP, Pearce RA, Zhang SC (2007) **Functional neural development from human embryonic stem cells: accelerated synaptic activity via astrocyte coculture.** Journal of Neuroscience 27:3069-3077.
- Kafitz KW, Rose CR, Konnerth A (2000) **Neurotrophin-evoked rapid excitation of central neurons.** Prog Brain Res 128:243-249.
- Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, Woltjen K (2009) **Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors.** Nature 458:771-775.
- Karadottir R, Hamilton NB, Bakiri Y, Attwell D (2008) **Spiking and nonspiking classes of oligodendrocyte precursor glia in CNS white matter.** Nat Neurosci 11:450-456.
- Kasanetz F, Riquelme LA, O'Donnell P, Murer MG (2006) **Turning off cortical ensembles stops striatal Up states and elicits phase perturbations in cortical and striatal slow oscillations in rat in vivo.** J Physiol 577:97-113.
- Kastenber ZJ, Odorico JS (2008) **Alternative sources of pluripotency: science, ethics, and stem cells.** Transplant Rev (Orlando) 22:215-222.
- Kirouac DC, Zandstra PW (2008) **The systematic production of cells for cell therapies.** Cell Stem Cell 3:369-381.
- Kirschstein R, Skirboll LR (2001) **Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions.** <http://stemcells.nih.gov/info/basics/defaultpage>
- Koch P, Opitz T, Steinbeck JA, Ladewig J, Brustle O (2009) **A rosette-type, self-renewing human ES cell-derived neural stem cell with potential for in vitro instruction and synaptic integration.** Proc Natl Acad Sci U S A 106:3225-3230.
- Kossack N, Meneses J, Shefi S, Nguyen HN, Chavez S, Nicholas C, Gromoll J, Turek PJ, Reijo-Pera RA (2009) **Isolation and characterization of pluripotent human spermatogonial stem cell-derived cells.** Stem Cells 27:138-149.

- Lang RJ, Haynes JM, Kelly J, Johnson J, Greenhalgh J, O'Brien C, Mulholland EM, Baker L, Munsie M, Pouton CW (2004) **Electrical and neurotransmitter activity of mature neurons derived from mouse embryonic stem cells by Sox-1 lineage selection and directed differentiation.** *Eur J Neurosci* 20:3209-3221.
- Lindner M, Brandt MC, Sauer H, Hescheler J, Bohle T, Beuckelmann DJ (2002) **Calcium sparks in human ventricular cardiomyocytes from patients with terminal heart failure.** *Cell Calcium* 31:175-182.
- Liour SS, Kraemer SA, Dinkins MB, Su CY, Yanagisawa M, Yu RK (2006) **Further characterization of embryonic stem cell-derived radial glial cells.** *Glia* 53:43-56.
- Liu A, Niswander LA (2005) **Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development.** *Nat Rev Neurosci* 6:945-954.
- Maden M (2007) **Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system.** *Nat Rev Neurosci* 8:755-765.
- Mahon S, Deniau JM, Charpier S (2001) **Relationship between EEG potentials and intracellular activity of striatal and cortico-striatal neurons: an in vivo study under different anesthetics.** *Cereb Cortex* 11:360-373.
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C (2004) **Interneurons of the neocortical inhibitory system.** *Nat Rev Neurosci* 5:793-807.
- Moser EI, Kropff E, Moser MB (2008) **Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system.** *Annu Rev Neurosci* 31:69-89.
- Muotri AR, Nakashima K, Toni N, Sandler VM, Gage FH (2005) **Development of functional human embryonic stem cell-derived neurons in mouse brain.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:18644-18648.
- Nakamura M, Okano H, Toyama Y, Dai HN, Finn TP, Bregman BS (2005) **Transplantation of embryonic spinal cord-derived neurospheres support growth of supraspinal projections and functional recovery after spinal cord injury in the neonatal rat.** *J Neurosci Res* 81:457-468.
- Nat R, Nilbratt M, Narkilahti S, Winblad B, Hovatta O, Nordberg A (2007) **Neurogenic neuroepithelial and radial glial cells generated from six human embryonic stem cell lines in serum-free suspension and adherent cultures.** *Glia* 55:385-399.
- Nilsson OG, Polito A, Saveland H, Ungerstedt U, Nordstrom CH (2006) **Are primary supratentorial intracerebral hemorrhages surrounded by a biochemical penumbra? A microdialysis study.** *Neurosurgery* 59:521-528; discussion 521-528.
- Nishimura F, Yoshikawa M, Kanda S, Nonaka M, Yokota H, Shiroy A, Nakase H, Hirabayashi H, Ouji Y, Birumachi J, Ishizaka S, Sakaki T (2003) **Potential use of embryonic stem cells for the treatment of mouse parkinsonian models:**

- improved behavior by transplantation of in vitro differentiated dopaminergic neurons from embryonic stem cells.** *Stem Cells* 21:171-180.
- Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, Segal M, McKay RD (1996) **Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro.** *Mech Dev* 59:89-102.
- Okada Y, Matsumoto A, Shimazaki T, Enoki R, Koizumi A, Ishii S, Itoyama Y, Sobue G, Okano H (2008) **Spatiotemporal recapitulation of central nervous system development by murine embryonic stem cell-derived neural stem/progenitor cells.** *Stem Cells* 26:3086-3098.
- Okuno T, Nakayama T, Konishi N, Michibata H, Wakimoto K, Suzuki Y, Nito S, Inaba T, Nakano I, Muramatsu S, Takano M, Kondo Y, Inoue N (2009) **Self-contained induction of neurons from human embryonic stem cells.** *PLoS One* 4:e6318.
- Perez-Bouza A, Glaser T, Brustle O (2005) **ES cell-derived glial precursors contribute to remyelination in acutely demyelinated spinal cord lesions.** *Brain Pathol* 15:208-216.
- Purves (2006) **Neuroscience**, 3rd edition Edition: Sinauer Associates.
- Ramirez JM, Tryba AK, Pena F (2004) **Pacemaker neurons and neuronal networks: an integrative view.** *Curr Opin Neurobiol* 14:665-674.
- Real MA, Davila JC, Guirado S (2006) **Immunohistochemical localization of the vesicular glutamate transporter VGLUT2 in the developing and adult mouse claustrum.** *J Chem Neuroanat* 31:169-177.
- Reppel M, Pillekamp F, Lu ZJ, Halbach M, Brockmeier K, Fleischmann BK, Hescheler J (2004) **Microelectrode arrays: a new tool to measure embryonic heart activity.** *J Electrocardiol* 37 Suppl:104-109.
- Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A (2000) **Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro.** *Nat Biotechnol* 18:399-404.
- Reynolds BA, Weiss S (1992) **Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system.** *Science* 255:1707-1710.
- Roy NS, Cleren C, Singh SK, Yang L, Beal MF, Goldman SA (2006) **Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes.** *Nat Med* 12:1259-1268.
- Shindo T, Matsumoto Y, Wang Q, Kawai N, Tamiya T, Nagao S (2006) **Differences in the neuronal stem cells survival, neuronal differentiation and neurological improvement after transplantation of neural stem cells between mild and severe experimental traumatic brain injury.** *J Med Invest* 53:42-51.
- Singer W (1999) **Neuronal synchrony: a versatile code for the definition of relations?** *Neuron* 24:49-65, 111-125.

- Slezak M, Pfrieder FW (2003) **New roles for astrocytes: regulation of CNS synaptogenesis**. Trends Neurosci 26:531-535.
- Smith S, Neaves W, Teitelbaum S (2007) **Adult versus embryonic stem cells: treatments**. Science 316:1422-1423; author reply 1422-1423.
- Sturm AK, König P (2001) **Mechanisms to synchronize neuronal activity**. Biol Cybern 84:153-172.
- Takahashi K, Yamanaka S (2006) **Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors**. Cell 126:663-676.
- Tannahill D, Harris LW, Keynes R (2005) **Role of morphogens in brain growth**. J Neurobiol 64:367-375.
- Tateno T, Kawana A, Jimbo Y (2002) **Analytical characterization of spontaneous firing in networks of developing rat cultured cortical neurons**. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys 65:051924.
- Temple S (2001) **The development of neural stem cells**. Nature 414:112-117.
- Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW (2002) **Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion**. Nature 416:542-545.
- Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, Hearn JP (1995) **Isolation of a primate embryonic stem cell line**. Proc Natl Acad Sci U S A 92:7844-7848.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998) **Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts**. Science 282:1145-1147.
- Toczyłowska B, Chalimoniuk M, Wodowska M, Mayzner-Zawadzka E (2006) **Changes in concentration of cerebrospinal fluid components in patients with traumatic brain injury**. Brain Res 1104:183-189.
- van Bergen A, Papanikolaou T, Schuker A, Moller A, Schlosshauer B (2003) **Long-term stimulation of mouse hippocampal slice culture on microelectrode array**. Brain Res Brain Res Protoc 11:123-133.
- Van Pelt J, Corner MA, Wolters PS, Rutten WL, Ramakers GJ (2004) **Longterm stability and developmental changes in spontaneous network burst firing patterns in dissociated rat cerebral cortex cell cultures on multielectrode arrays**. Neurosci Lett 361:86-89.
- Wagenaar DA, Pine J, Potter SM (2006) **An extremely rich repertoire of bursting patterns during the development of cortical cultures**. BMC Neurosci 7:11.
- Watanabe K, Kamiya D, Nishiyama A, Katayama T, Nozaki S, Kawasaki H, Watanabe Y, Mizuseki K, Sasai Y (2005) **Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells**. Nat Neurosci 8:288-296.

- Webber DJ, Bradbury EJ, McMahon SB, Minger SL (2007) **Transplanted neural progenitor cells survive and differentiate but achieve limited functional recovery in the lesioned adult rat spinal cord.** *Regen Med* 2:929-945.
- Wernig M, Benninger F, Schmandt T, Rade M, Tucker KL, Bussow H, Beck H, Brustle O (2004) **Functional integration of embryonic stem cell-derived neurons in vivo.** *J Neurosci* 24:5258-5268.
- Wilson PG, Stice SS (2006) **Development and differentiation of neural rosettes derived from human embryonic stem cells.** *Stem Cell Rev* 2:67-77.
- Wonders CP, Anderson SA (2006) **The origin and specification of cortical interneurons.** *Nat Rev Neurosci* 7:687-696.
- Xu R, Jiang X, Guo Z, Chen J, Zou Y, Ke Y, Zhang S, Li Z, Cai Y, Du M, Qin L, Tang Y, Zeng Y (2008) **Functional analysis of neuron-like cells differentiated from neural stem cells derived from bone marrow stroma cells in vitro.** *Cell Mol Neurobiol* 28:545-558.
- Yaari Y, Beck H (2002) **"Epileptic neurons" in temporal lobe epilepsy.** *Brain Pathol* 12:234-239.
- Yeung CK, Sommerhage F, Wrobel G, Law JK, Offenhausser A, Rudd JA, Ingebrandt S, Chan M (2009) **To establish a pharmacological experimental platform for the study of cardiac hypoxia using the microelectrode array.** *J Pharmacol Toxicol Methods* 59:146-152.
- Ying QL, Stavridis M, Griffiths D, Li M, Smith A (2003) **Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture.** *Nat Biotechnol* 21:183-186.
- Yvon C, Czarnecki A, Streit J (2007) **Riluzole-induced oscillations in spinal networks.** *J Neurophysiol* 97:3607-3620.
- Zhang PL, Izrael M, Ainbinder E, Ben-Simchon L, Chebath J, Revel M (2006) **Increased myelinating capacity of embryonic stem cell derived oligodendrocyte precursors after treatment by interleukin-6/soluble interleukin-6 receptor fusion protein.** *Mol Cell Neurosci* 31:387-398.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AP5	2-Amino-5-phosphonopentansäure
aCSF	artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit
Bf-1	Brain Factor-1
BMP	Bone Morphogen Protein
EAS	exzitatorischer Aminosäuren
EB	Embryoid Body
EEG	Elektroenzephalographie
EGF	Epidermal Growth Factor
EKoG	Elektrokortikogramm
ES Zelle	embryonalen Stammzelle
FGF	Fibroblast Growth Factor
fMRT	funktionellen Magnetresonanz-Tomographie
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
iPS	induziert-pluripotenten Stammzellen
LCS	Liquor cerebrospinalis
MEA	Multielektroden-Array
MEG	Magnetoenzephalographie
MNP	monolayer neural precursors
MU	Multiunit Array
NE	neuroepithelial
Nkx	NK2 Homeobox
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
RG	radiale Glia
nSFEB	neural precursor cell-enriched SFEB
PAX	Paired Box
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
SFEB	Serum-free, Floating Cultures of Embryoid Body-like Aggregates
SNP	sekundärer neuraler Zellpopulationen
SOX	SRY-box-containing-gene
tLCS-high	Trauma-Liquor Fraktionen mit hochmolekularen Molekülen
tLCS-low	Trauma-Liquor Fraktionen mit niedermolekularen Molekülen
TGF	Transforming Growth Factor
vGlut2	vesikulären Glutamatttransporter 2
Wnt	Wingless-related MMTV Integration Site

## 9 Publikationen

### **Development and pharmacological modulation of embryonic stem cell-derived neuronal network activity.**

Sebastian Illes, Wiebke Fleischer, Mario Siebler, Hans-Peter Hartung, Marcel Dihné  
*Experimental Neurology*, 2007, July, 207 171–176

### **Niche-dependent development of functional neuronal networks from embryonic stem cell-derived neural populations.**

Sebastian Illes, Stephan Theiss, Hans-Peter Hartung, Mario Siebler, Marcel Dihné *BMC Neuroscience*, online 2009, August (in press)

### **Cerebrospinal fluid of brain trauma patients inhibits neuronal network function.**

Frauke Otto\*, Sebastian Illes\*, Jessica Opatz, Maurice Laryea, Stephan Theiss, Hans-Peter Hartung, Alfons Schnitzler, Mario Siebler\*\*, Marcel Dihné\*\*

\*F.O. and S.I. contributed equally to this work. \*\*M.S. and M.D. share senior authorship.

*Annals of Neurology*, 2009, (in press)

# ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbständig verfasst und bei keiner anderen Fakultät eingereicht und dass ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Es handelt sich bei der heute von mir eingereichten Dissertation um drei in Wort und Bild völlig übereinstimmende Exemplare.

Weiterhin erkläre ich, dass digitale Abbildungen nur die originalen Daten enthalten und in keinem Fall inhaltsverändernde Bildverarbeitung vorgenommen wurde.

Düsseldorf, den 15.10.2009

---

Sebastian Illes



## **DANKSAGUNG**

Herrn Dr. Marcel Dihné danke ich herzlich dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Doktorarbeit durchzuführen. Ich danke ihm insbesondere für seine Hilfe und Unterstützung.

Für die Übernahme des Referats danke ich Herrn Prof. Dr. Hans-Werner Müller.

Für die Übernahme des Korreferats danke ich Frau Prof. Dr. Christine Rose.

Einen besonderen Dank möchte ich allen wissenschaftlichen und technischen Mitarbeitern des Labors für Molekulare Neurobiologie für die vielfältige Unterstützung und das gute Arbeitsklima aussprechen. Im besonderen Maße möchte ich Frau Christine Holland für ihre ausgezeichnete Hilfe bei den vielen MEA Messungen danken.

Meinen Doktor-Schwestern und -Brüdern danke ich für die schöne gemeinsame Zeit und den regen Gedankenaustausch.

Meiner Familie und meinen lieben Freunden, möchte ich ganz herzlich für Ihre Geduld, ihre Hilfe und ihre kostbare Unterstützung danken sowie dafür, dass sie immer an mich geglaubt haben. Insbesondere möchte ich bei Eva, Reni, Neo und Christine für die Geduld und besonders für das Korrekturlesen meiner Arbeit bedanken.



## Short Communication

## Development and pharmacological modulation of embryonic stem cell-derived neuronal network activity

Sebastian Illes, Wiebke Fleischer, Mario Siebler, Hans-Peter Hartung, Marcel Dihné \*

*Department of Neurology, University Hospital Düsseldorf, Heinrich-Heine University, Germany*

Received 24 January 2007; revised 14 May 2007; accepted 24 May 2007

Available online 2 June 2007

---

**Abstract**

Embryonic stem cells can be differentiated into neurons of diverse neurotransmitter-specific phenotypes. While the time course of functional progression of ES cell-derived neural precursors towards mature neurons has been described in detail on single-cell level, the temporal development and pharmacological modulation of ES cell-derived neuronal network activity have not been explored yet. Neuronal network activity can be assessed by the microelectrode array (MEA) technology that allows simultaneous monitoring of the electrical activity exhibited by entire populations of neurons over several weeks or months *in vitro*.

We demonstrate here that ES cell-derived neural precursors cultured on MEAs for 5 to 6 weeks develop neuronal networks with oscillating and synchronous spike patterns via distinct states of activity and change electrophysiological characteristics even after 5 to 6 weeks in culture pointing towards late maturational processes. These processes were accompanied by an increasing density of presynaptic vesicles. Furthermore, we demonstrated that ES cell-derived network activity was sensitive to synaptically acting drugs indicating that pharmacologically susceptible neuronal networks were generated. Thus, the MEA technology represents a powerful tool to describe the temporal progression of stem cell-derived neural populations towards mature, functioning neuronal networks that can be applied to investigate pharmacologically active compounds.

© 2007 Published by Elsevier Inc.

**Keywords:** Embryonic stem cell; Neuron; Neuronal network; Multielectrode array; Embryonic stem cell derived neurons; Embryonic stem cell derived neuronal network

---

Embryonic stem (ES) cell-derived neurons open up new ways for the treatment of neurodegenerative diseases, e.g., by the substitution of lost neurons via cell therapy. For this purpose, ES cell-derived progeny needs to develop and to integrate into functional neuronal networks. Neuronal networks can be described as populations of synaptically interconnected neurons capable of generating electrophysiological activity that can spread spatially and temporally. Thus, neuronal networks represent the basic principle for brain activity.

In a multitude of *in vitro* and *in vivo* studies ES cell-derived neurons were characterized in detail concerning their specific genetic phenotype (Brüstle and McKay, 1996; Kim et al., 2002; Lee et al., 2000; Okabe et al., 1996). In addition, detailed electrophysiological investigations *in vitro* and *in vivo* after transplantation using the patch clamp method were performed to demonstrate on a single-cell level the basic electrophysiological properties of ES cell-

derived neurons, e.g., the capacity to generate action potentials and form functional synapses (Bain et al., 1995; Bühnemann et al., in press; Finley et al., 1996; Jüngling et al., 2003; Strübing et al., 1995). Transplanted single ES cell-derived neurons were also documented to integrate into cortical and hippocampal neuronal networks and receive synaptic input (Benninger et al., 2003; Wernig et al., 2004). Very recently, it was reported that populations of ES cell-derived neurons can form an intrinsic functional neuronal network *in vitro* as assessed by the microelectrode array (MEA) technology (Ban et al., 2006). MEAs render possible a close contact between cultured cells and multiple electrodes, which detect action potentials via extracellular recordings. Combinations of MEAs and neurons are then referred to as bio-electronic hybrids or neurochips (Fromherz et al., 1991). In contrast to the patch clamp technique, MEA recordings are non-invasive and are capable of visualizing the spatial and temporal distribution of action potentials generated by entire neuronal populations. In the present study we use the MEA technology to describe the gradual immunocytochemical and functional development of ES cell-derived neuronal populations

---

\* Corresponding author.

E-mail address: [marcel.dihne@uni-duesseldorf.de](mailto:marcel.dihne@uni-duesseldorf.de) (M. Dihné).

over several weeks *in vitro* towards synchronously oscillating neuronal networks and to determine their reactions to synaptically active substances.

An ES cell line constitutively expressing enhanced green fluorescent protein (EGFP) under the influence of the chicken  $\beta$ -actin promoter and the R1 cell line was used for this study (Dihné et al., 2006; Nagy et al., 1993). Maintenance of undifferentiated ES cells, embryoid body formation and selection of neural precursor cells were carried out as described (Lee et al., 2000; Okabe et al., 1996) with minor modifications. Briefly, undifferentiated (stage 1) ES cells were expanded in the presence of 1000 U/ml leukemia inhibitory factor (LIF; Chemicon, Temecula, CA). After formation of embryoid bodies (stage 2) in the absence of LIF, selection of neural precursors was initiated with Dulbecco's minimal essential medium (DMEM)/F12 supplemented with 5  $\mu$ g/ml insulin, 50  $\mu$ g/ml transferrin, 30 nM selenium chloride and 5  $\mu$ g/ml fibronectin for 8 days (stage 3). Selected neural precursors were expanded (stage 4) in DMEM/F12 medium supplemented with 2% B-27, 2 mM L-glutamine, penicillin 5000 U/ml, streptomycin 5000  $\mu$ g/ml (stage 4-medium) and FGF-2 (20 ng/ml, ProSpec.). Neural precursor cells in stage 4 were seeded either onto poly-L-ornithine-coated cell culture dishes for propagation or glass coverslips for immunocytochemical investigations at a density of 100,000 cells/ml medium. For the neurochip experiments stage 4 neural precursor cells were seeded onto poly-L-ornithine (15  $\mu$ g/ml, Sigma)- and laminin (5  $\mu$ g/ml, Sigma)-coated MEAs at a density of 15,000 cells/mm<sup>2</sup>.

For immunocytochemical investigations, cultured cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.3 and fixed for 15 min in 4% paraformaldehyde before incubation with 1% normal goat serum (NGS, Sigma) in PBS for 1 h. Primary antibodies were monoclonal mouse antibodies to  $\beta$ -tubulin III (1:750, R&D Systems), nestin (1:750, Chemicon) and, synaptophysin (1:100, Sigma). They were applied over night at 4 °C. After washing in PBS, appropriate secondary antibodies coupled to Cy2 or Cy3 (1:750, Dianova, Hamburg, Germany) were applied for 1 h at room temperature. Cell cultures were counterstained for 1 min with DAPI (2  $\mu$ g/ml, Serva) to visualize cell nuclei. More than 95% of stage 4 neural precursor cells expressed nestin and the neural cell adhesion molecule (NCAM) and proliferated in the presence of FGF-2. Removal of FGF-2 5 days after seeding of ES cell-derived precursors led to the differentiation of stage 4 neural precursors into the three principal cell types of the central nervous system. This stage is referred to as stage 5 (Okabe et al., 1996). The composition of stages 4 and 5 neural cell populations has been characterized (Dihné et al., 2006).

MEA recordings and immunocytochemistry were performed weekly, commencing 7 days after initiating the differentiation. Attachment of ES cell-derived neural precursors on MEAs was similar in comparison to the attachment on culture dishes or glass coverslips. Also the temporal development of confluency and the morphology of single cells were similar under all cell culture conditions. To preserve re-usability of MEAs, immunocytochemistry was done only on glass coverslips as

paraformaldehyde fixation would possibly cause corrosion of the electrodes. To measure electrophysiological activity of ES cell-derived neurons we used MEAs with a square grid of 60 planar Ti/TiN microelectrodes (30- $\mu$ m diameter, 200- $\mu$ m spacing) with an input impedance of <50 k $\Omega$  according to the specifications of the manufacturer (Multi Channel Systems, Reutlingen, Germany). Signals from all 60 electrodes were simultaneously sampled at 25 kHz, visualized and stored using the standard software MC\_Rack provided by Multi Channel Systems (Reutlingen, Germany). Spike and burst detection was performed off-line by custom-built software (Result, Tönisvorst, Germany). Individually for each channel, the threshold for spike detection was set to eight standard deviations (SDs) of the average noise amplitude during a 10% "learning phase" at the beginning of each measurement. An absolute refractory period of 4 ms and a maximum spike width of 2 ms were imposed on the spike detection algorithm. All spike waveforms were stored separately and visually inspected for artefacts. The burst detection relied on an entropy-based algorithm. Minimum

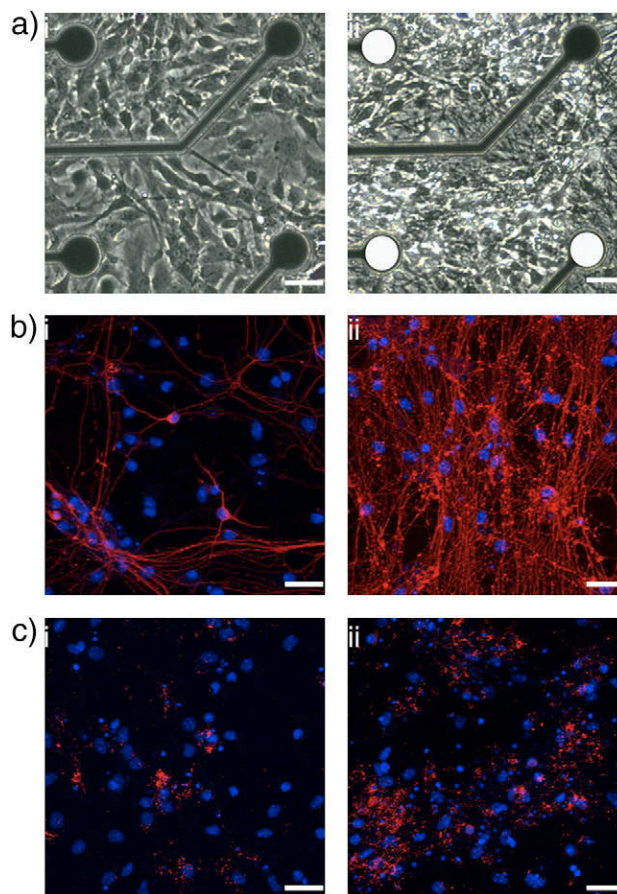


Fig. 1. ES cell-derived neurons at different time points after initiating the differentiation. Phase-contrast images (a) of ES cell-derived cells on MEAs and immunocytochemical stainings for (b)  $\beta$ -tubulin or (c) synaptophysin of ES cell-derived neurons on coverslips at 7 (i) or 28 days (ii) after initiating the differentiation. Note the dense network of neurites at 28 days after initiating the differentiation in comparison to 7 days (a, i and ii) correlating to increased numbers of  $\beta$ -tubulin<sup>+</sup> or synaptophysin<sup>+</sup> structures (b, c, i and ii). White-labeled electrodes indicate the appearance of spontaneous action potentials while black-labeled electrodes detected no action potentials (a, i and ii). Scale bar = 30  $\mu$ m.

entropy of five was required for a sequence of at least three spikes to constitute a burst. Bursts were also verified by visual inspection for plausibility. To examine the effect of the sodium-channel blocker tetrodotoxin (TTX) on electrical activity of ES cell-derived neurons we determined the baseline activity of the cells in nutrition medium in MEA recordings of 2-min duration followed by recordings with increasing concentrations of TTX in the medium (up to 60 nM). We calculated the respective change in spike activity after substance application compared to baseline activity. Experiments with the synaptic-acting agonists

GABA (gamma-aminobutyric acid) and NMDA (*N*-methyl-D-aspartate) alone and in combination with their respective antagonists bicuculline and APV (2-amino-5-phosphonovaleate) were performed in magnesium-free salt solution (150 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 4 mM KCl, 10 mM HEPES, 10 mM D-glucose, pH 7.4). Prior to each substance application and after washout we performed control measurements in bath solution to determine the degree of reversibility. Average spike rates of these two recordings were set as baseline values for changes in activity due to substance application. All data that are described

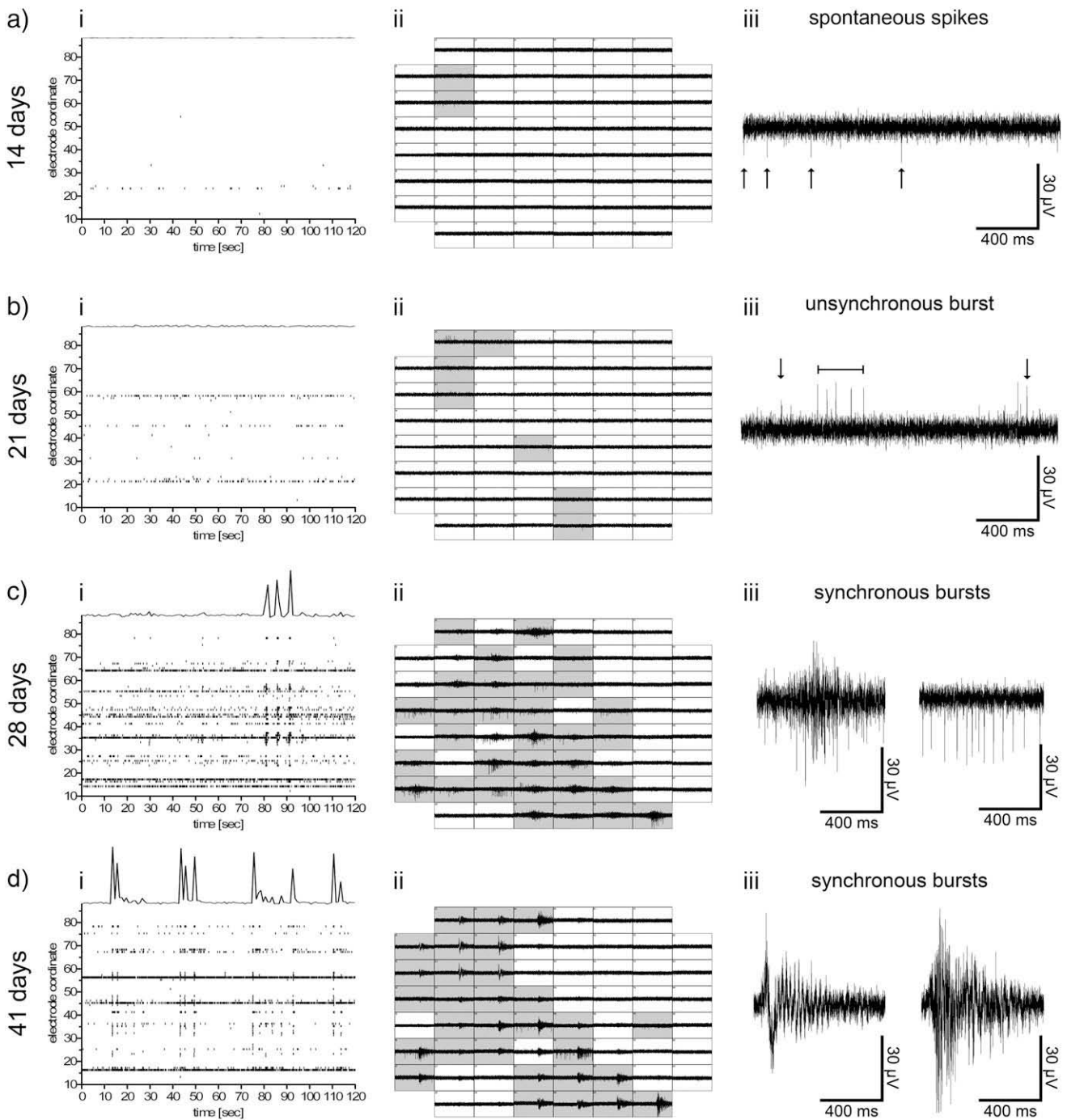


Fig. 2.

here were cumulated from several experiments of 4 different MEA cultures and repeated at least 3 times.

After initiating the differentiation of ES cell-derived precursors the number of neurons that express  $\beta$ -tubulin or synaptophysin increased with time (Fig. 1). The first single, spontaneous action potentials of ES cell-derived neurons were observed between 7 and 14 days after initiating the differentiation of neural precursors (Fig. 2a). On average,  $5 \pm 3$  of the 60 electrodes detected action potentials (APs) 14 days after initiating the differentiation. Electrodes that detected APs are

later referred to as “active electrodes”. The mean frequency of APs was  $4.5 \pm 3.3$  Hz. The shape and amplitude of APs detected by extracellular recordings not only depend on the distance between electrode and signal source but also on the cellular compartment from where the signal originates. Claverol-Tinture and Pine (2002) showed that monophasic spikes with negative or positive peaks can be recorded from the soma or axon of cells, but multiphasic spikes are limited to APs detected from the soma. We recorded majority of multiphasic spikes that, thus, might represent somatic APs and a small amount of monophasic spikes

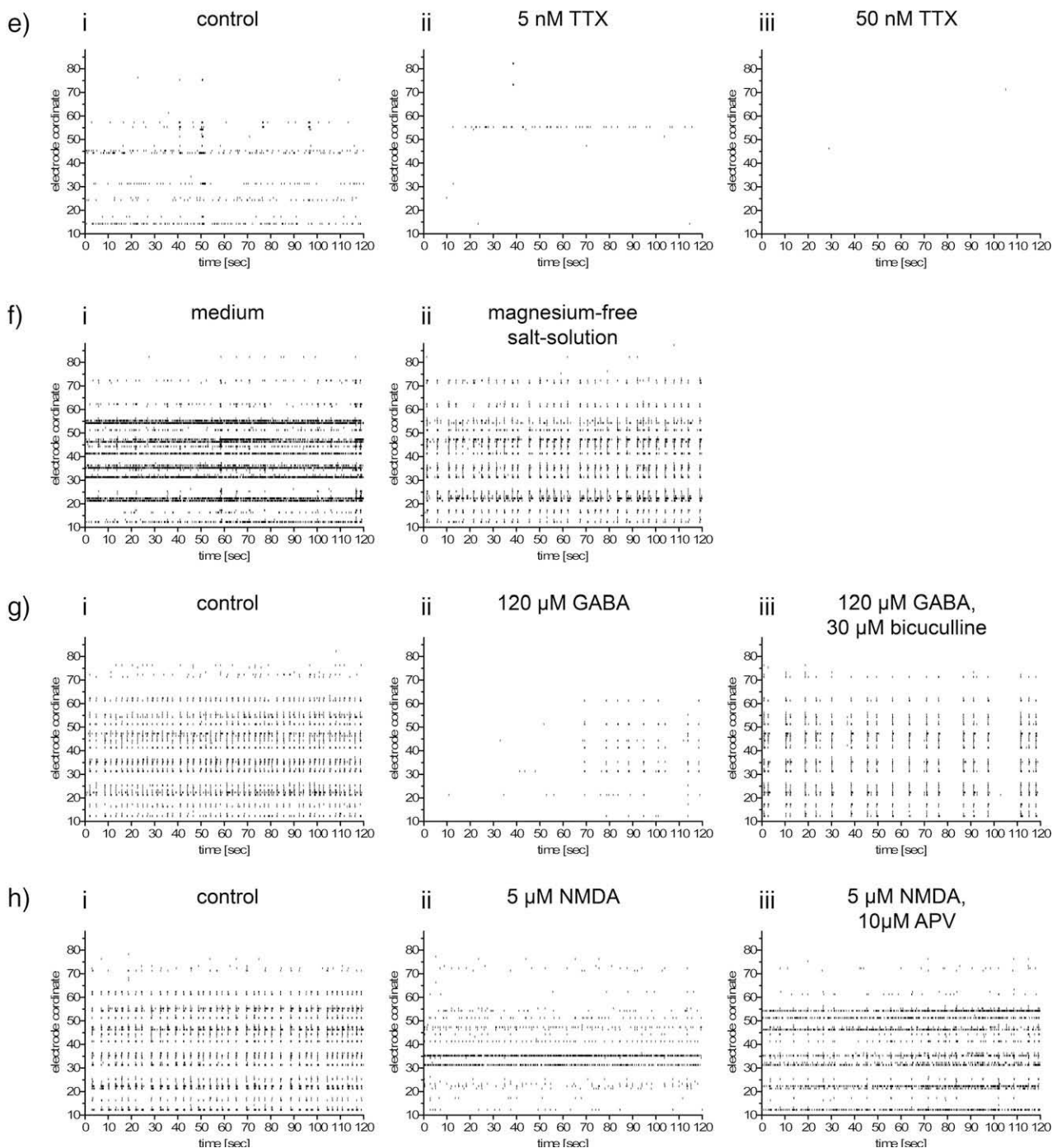


Fig. 2 (continued).

with positive or negative peaks indicative for somatic or axonal APs (data not shown). At 21 days after initiating the differentiation the number of active electrodes had increased ( $16 \pm 7$  of 60, Fig. 2b). In addition to single, spontaneous APs, we now observed bursts of APs characterized by at least  $5 \pm 2$  APs within  $\sim 300$  ms (Fig. 2b). At approximately 28 days after initiating the differentiation we observed synchronous bursts on different electrodes ( $\sim 32$  of 60, Fig. 2c). Electrodes that recorded synchronous activity are later referred to as “coupled electrodes”. The shortest time interval between synchronous bursts amounted to  $\sim 2$  s. We never observed separated groups of coupled electrodes with shifted oscillations on the same MEA. All coupled electrodes were linked to each other indicating that the synchronous bursting activity was propagated continuously to the maximum ascertainable distance of 1.6 mm. We identified 2 different burst modes at 28 days after initiating the differentiation. Some bursts contained dispersed spikes of approximately equal amplitudes (“constant mode”, Fig. 2c, iii, right panel), whereas others were characterized by a higher spike density and an amplitude-increasing phase followed by an amplitude-decreasing phase (“two-phase-mode”, Fig. 2c, iii, left panel). Approximately 41 days after initiating the differentiation we observed the highest frequency of synchronously oscillating bursts (Figs. 2d, i, ii). Interestingly, at 41 days we observed no bursts organized in the constant mode but differently shaped two-phase-mode bursts with a short and variable amplitude-increasing phase and a prolonged amplitude-decreasing phase (Figs. 2d, iii, left and right panels).

Pharmacological investigations demonstrated that ES cell-derived neuronal network activity recorded by MEAs at 28 days after initiating the differentiation can be suppressed or modified by different substances. As expected, single APs, bursts of APs and synchronous bursting activity could be suppressed in a dose-dependent manner by blocking voltage-gated  $\text{Na}^+$  currents with different concentrations of tetrodotoxin (TTX, Fig. 2e). While magnesium-free salt solution led to an increase in synchronous activity (Fig. 2f), GABA (Fig. 2g) and NMDA (Fig. 2h) decreased synchronous activity of ES cell-derived neuronal networks on MEAs at 28 days. While GABA application

resulted in a reduction of both synchronous and uncorrelated activity (Fig. 2g, ii), NMDA application resulted in a reduction of synchronous activity whereas uncorrelated activity was preserved (Fig. 2h, ii). The GABA-receptor antagonist bicuculline and the NMDA-receptor antagonist APV partially compensated those effects (Figs. 2g, h, iii), respectively. We also investigated cultures at 21 days after initiating the differentiation that did not yet show synchronous bursting but only uncorrelated activity. Interestingly, we found that inhibition of neuronal GABAergic transmission by bicuculline in these cultures resulted in the occurrence of synchronous network activity. The application of NMDA did not stimulate these younger cultures to generate synchronous network activity. The application of GABA or APV in 21-day cultures led to a decrease in uncorrelated activity (data not shown).

Our experiments demonstrate that pluripotent embryonic stem cells can be directed towards an advanced stage of functional neuronal connectivity via distinct states of activity in which they are able to generate pharmacologically susceptible neuronal networks similar to those found in primary cortical cultures (Otto et al., 2003). It was demonstrated here that an increase of spatially distributed spike activity within a population of ES cell-derived cells is accompanied by an increase of  $\beta$ -tubulin<sup>+</sup> and synaptophysin<sup>+</sup> structures finally resulting in synchronously oscillating burst activity at 4 weeks after initiating the differentiation of ES cell-derived neural precursors. While between 2 and 3 weeks after seeding a gradual increase of uncorrelated spatially distributed spike activity was detected, we saw correlated network activity between 4 and 6 weeks that was characterized by quantitative and qualitative changes over time concerning the frequency of synchronous bursts and the occurrence of two different burst modes. At 4 weeks we observed both, constant-mode bursts and two-phase-mode bursts, but we only observed two-phase-mode bursts at 5 to 6 weeks. As these two-phase-mode bursts showed a higher spike frequency and increasing–decreasing spike amplitudes, they might reflect a further maturation step of ES cell-derived neuronal networks even after a culture period of more than 1 month. This illustrates that also at late time points after

Fig. 2. Development and pharmacological modulation of ES cell-derived neuronal network activity. Spike raster plots (SRPs, a–d, i) with frequency counts (panel above the SRPs) and snap shot images of 2 s of MEA recordings (a–d, ii and iii) at 14 (a), 21 (b), 28 (c) and 41 (d) days after initiating the differentiation of ES cell-derived neural precursors. SRPs illustrate the temporal and spatial distribution of action potentials (dots) and the frequency of synchronous activity (frequency counts) detected by different MEA electrodes ( $y$ -axis) over a time period of 120 s ( $x$ -axis). Snap shot images of MEA recordings illustrate the distribution (ii) and typical shape (iii) of the detected signals. Note that each chamber represents the activity of one specific electrode. Grey chambers represent active electrodes. At 14 days (a) after initiating the differentiation, single uncorrelated spontaneous spikes are detected on some electrodes. At 21 days (b), spike activity is recorded by a higher number of electrodes and bursts of action potentials (b, iii) appeared. At 28 days (c), synchronously oscillating bursts are detected on different MEA electrodes. At 41 days the frequency of synchronous burst increases as it can be seen in the frequency counts. Larger view examples of spiking activities on representative electrodes (iii) illustrate the progressive development of spiking activity from single spontaneous action potentials (arrows) at 14 days (a) after initiating the differentiation, towards the appearance of bursts (bar) of action potentials at 21 days (b). Note that the morphology of bursts between 21 and 41 days after initiating the differentiation changes. While bursts at 21 days contain only few consecutive spikes, bursts at 28 days consist of higher number of spikes and last a longer time period. At this time point two different burst modes are distinguished: the two-phase mode (c, iii, left panel) containing densely packed spikes with increasing–decreasing amplitudes and the constant mode (c, iii, right panel) containing fewer spikes of constant amplitudes. At 41 days only bursts organized in the two-phase mode are observed. Note the shape variations in the amplitude-increasing phase (d, ii, iii, left and right panel). SRPs illustrate the neuronal network activity in nutrition medium (e, f, i) and magnesium-free salt solution (f, ii, g, h) before and after application of different substances. At 28 days after the induction of differentiation single spikes and synchronous burst activity are reduced in a dose-dependent manner after application of 5 nM (e, ii) or 50 nM (e, iii) TTX, respectively. Measurements of neuronal populations supplemented with nutrition medium reveal single spike and synchronous burst activity (f, i). Substitution of medium by a magnesium-free salt solution increases synchronous burst activity and decreases uncorrelated activity (f, ii). Application of GABA [120  $\mu\text{M}$ ] to the magnesium-free salt solution results in a reduction of both synchronous and uncorrelated activity (g, i, ii). This effect can be partly recovered by additional application of the GABA-receptor antagonist bicuculline [30  $\mu\text{M}$ ] (g, iii). Application of 5  $\mu\text{M}$  NMDA results in a broad loss of synchronous burst activity while uncorrelated activity is preserved (h, ii). This effect can be partly antagonized by additional application of 10  $\mu\text{M}$  APV (h, iii).

initiating the differentiation ES cell-derived neuronal populations still undergo plastic changes concerning their concerted electrophysiological activity, which can be visualized by the MEA technology. Similar processes are also described for primary neuronal cultures, showing that ES cell-derived neuronal networks represent a valid equivalent for neuronal networks derived from primary cultures (Van Pelt et al., 2004).

The maturity and functionality of ES cell-derived neuronal populations recorded on MEAs at late time points was confirmed through their adequate behavior in reaction to pharmacologically active substances. To our knowledge, this is the first study that investigates the pharmacological modulation of ES cell-derived neuronal networks. Similar to primary neuronal networks (Legrand et al., 2004), the modulation of synchronous activity by tetrodotoxin, NMDA, GABA, APV, bicuculline and magnesium shows that voltage-gated Na<sup>+</sup> channels and the typical excitatory and inhibitory receptors are involved in the functional activity of ES cell-derived neuronal networks. Furthermore, we observed that 3-week-old cultures with only uncorrelated spike activity can be stimulated to generate a quasi premature synchronous network activity by the inhibition of intrinsic GABAergic transmission. This suggests that the structural prerequisites for ES cell-derived neural populations to generate neuronal network activity might precede its spontaneous electrophysiological occurrence of about 1 week. That the inhibition of intrinsic GABAergic transmission can transduce uncorrelated spike activity towards a synchronous network activity was also demonstrated for primary hippocampal networks (Arnold et al., 2005) underlining that ES cell-derived neuronal populations can reproduce physiological network characteristics. Thus, the MEA technology might shed some light on developmental aspects of different transmitter-specific neuronal populations and their selective contribution to network activity. As *in vivo* experiments show that transplanted ES cell-derived neurons are able to communicate with host neurons (Benninger et al., 2003; Wernig et al., 2004), knowledge about the network activity of distinct ES cell-derived transmitter-specific neuronal populations at different developmental stages is important also for further transplantation studies.

In summary, we could demonstrate that the fusion of ES cell and the MEA technology might represent a powerful tool to describe the long-term electrophysiological development and the pharmacological reactions of neuronal populations derived from immature, pluripotent stem cells. Specifically, by the selective inhibition of neurotransmitter-specific neuronal subtypes at different developmental stages, MEA recordings are suitable to unravel the functional contribution of different neurotransmitter systems to the functionality of entire ES cell-derived neuronal network activity.

## Acknowledgments

The authors are grateful to Melitta Schachner for providing embryonic stem cells, Marion Hendricks and David Kremer for assistance with the generation of embryonic stem cell-derived neural precursor cells. This work was supported by the "Bundesministerium für Bildung und Forschung" (BMBF, 01GN0503).

## References

- Arnold, F.J., Hofmann, F., Bengtson, C.P., Wittmann, M., Vanhoutte, P., Bading, H., 2005. Microelectrode array recordings of cultured hippocampal networks reveal a simple model for transcription and protein synthesis-dependent plasticity. *J. Physiol.* 564, 3–19.
- Bain, G., Kitchens, D., Yao, M., Huettner, J.E., Gottlieb, D.I., 1995. Embryonic stem cells express neuronal properties *in vitro*. *Dev. Biol.* 168, 342–357.
- Ban, J., Bonifazi, P., Pinato, G., Broccard, F., Studer, L., Torre, V., Ruaro, M.E., 2006. ES-derived neurons form functional networks *in vitro*. *Stem Cells* 25, 738–749.
- Benninger, F., Beck, H., Wernig, M., Tucker, K.L., Brüstle, O., Scheffler, B., 2003. Functional integration of embryonic stem cell-derived neurons in hippocampal slice cultures. *J. Neurosci.* 23, 7075–7083.
- Brüstle, O., McKay, R.D., 1996. Neuronal progenitors as tools for cell replacement in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6, 688–695.
- Bühnemann, C., Scholz, A., Bernreuther, C., Malik, C.Y., Braun, H., Schachner, M., Reymann, K.G., Dihne, M., in press. Neuronal differentiation of transplanted embryonic stem cell-derived precursors in stroke lesions of adult rats. *Brain*.
- Claverol-Tinture, E., Pine, J., 2002. Extracellular potentials in low-density dissociated neuronal cultures. *J. Neurosci. Methods* 117, 13–21.
- Dihne, M., Bernreuther, C., Hagel, C., Wesche, K.O., Schachner, M., 2006. Embryonic stem cell-derived neuronally committed precursor cells with reduced teratoma formation after transplantation into the lesioned adult mouse brain. *Stem Cells* 24, 1458–1466.
- Finley, M.F., Kulkarni, N., Huettner, J.E., 1996. Synapse formation and establishment of neuronal polarity by P19 embryonic carcinoma cells and embryonic stem cells. *J. Neurosci.* 16, 1056–1065.
- Fromherz, P., Offenhäusser, A., Vetter, T., Weis, J., 1991. A neuron-silicon junction: a Retzius cell of the leech on an insulated-gate field-effect transistor. *Science* 252, 1290–1293.
- Jüngling, K., Nagler, K., Pfrieger, F.W., Gottmann, K., 2003. Purification of embryonic stem cell-derived neurons by immunoisolation. *FASEB J.* 17, 2100–2102.
- Kim, J.H., Auerbach, J.M., Rodriguez-Gomez, J.A., Velasco, I., Gavin, D., Lumelsky, N., Lee, S.H., Nguyen, J., Sanchez-Pernate, R., Bankiewicz, K., McKay, R., 2002. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 418, 50–56.
- Lee, S.H., Lumelsky, N., Studer, L., Auerbach, J.M., McKay, R.D., 2000. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 18, 675–679.
- Legrand, J.C., Darbon, P., Streit, J., 2004. Contributions of NMDA receptors to network recruitment and rhythm generation in spinal cord cultures. *Eur. J. Neurosci.* 19, 521–532.
- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W., Roder, J.C., 1993. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 8424–8428.
- Okabe, S., Forsberg-Nilsson, K., Spiro, A.C., Segal, M., McKay, R.D., 1996. Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells *in vitro*. *Mech. Dev.* 59, 89–102.
- Otto, F., Görtz, P., Fleischer, W., Siebler, M., 2003. Cryopreserved rat cortical cells develop functional neuronal networks on microelectrode arrays. *J. Neurosci. Methods* 128, 173–181.
- Strübing, C., Ahnert-Hilger, G., Shan, J., Wiedenmann, B., Hescheler, J., Wobus, A.M., 1995. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage *in vitro* gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons. *Mech. Dev.* 53, 275–287.
- Van Pelt, J., Corner, M.A., Wolters, P.S., Rutten, W.L., Ramakers, G.J., 2004. Longterm stability and developmental changes in spontaneous network burst firing patterns in dissociated rat cerebral cortex cell cultures on multi-electrode arrays. *Neurosci. Lett.* 361, 86–89.
- Wernig, M., Benninger, F., Schmandt, T., Rade, M., Tucker, K.L., Bussow, H., Beck, H., Brüstle, O., 2004. Functional integration of embryonic stem cell-derived neurons *in vivo*. *J. Neurosci.* 24, 5258–5268.

## Niche-dependent development of functional neuronal networks from embryonic stem cell-derived neural populations

Sebastian Illes, Stephan Theiss, Hans-Peter Hartung, Mario Siebler and Marcel Dihné\*

Address: Department of Neurology, Heinrich-Heine University, Moorenstr. 5, 40225 Düsseldorf, Germany

Email: Sebastian Illes - [sebastian.illes@gmx.de](mailto:sebastian.illes@gmx.de); Stephan Theiss - [theiss@uni-duesseldorf.de](mailto:theiss@uni-duesseldorf.de); Hans-Peter Hartung - [Hans-Peter.Hartung@uni-duesseldorf.de](mailto:Hans-Peter.Hartung@uni-duesseldorf.de); Mario Siebler - [Mario.Siebler@mediclin.de](mailto:Mario.Siebler@mediclin.de); Marcel Dihné\* - [Marcel.Dihne@uni-duesseldorf.de](mailto:Marcel.Dihne@uni-duesseldorf.de)

\* Corresponding author

Published: 6 August 2009

Received: 31 March 2009

BMC Neuroscience 2009, 10:93 doi:10.1186/1471-2202-10-93

Accepted: 6 August 2009

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2202/10/93>

© 2009 Illes et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### Abstract

**Background:** The present work was performed to investigate the ability of two different embryonic stem (ES) cell-derived neural precursor populations to generate functional neuronal networks *in vitro*. The first ES cell-derived neural precursor population was cultivated as free-floating neural aggregates which are known to form a developmental niche comprising different types of neural cells, including neural precursor cells (NPCs), progenitor cells and even further matured cells. This niche provides by itself a variety of different growth factors and extracellular matrix proteins that influence the proliferation and differentiation of neural precursor and progenitor cells. The second population was cultivated adherently in monolayer cultures to control most stringently the extracellular environment. This population comprises highly homogeneous NPCs which are supposed to represent an attractive way to provide well-defined neuronal progeny. However, the ability of these different ES cell-derived immature neural cell populations to generate functional neuronal networks has not been assessed so far.

**Results:** While both precursor populations were shown to differentiate into sufficient quantities of mature NeuN<sup>+</sup> neurons that also express GABA or vesicular-glutamate-transporter-2 (vGlut2), only aggregate-derived neuronal populations exhibited a synchronously oscillating network activity 24 weeks after initiating the differentiation as detected by the microelectrode array technology. Neurons derived from homogeneous NPCs within monolayer cultures did merely show uncorrelated spiking activity even when differentiated for up to 12 weeks. We demonstrated that these neurons exhibited sparsely ramified neurites and an embryonic vGlut2 distribution suggesting an inhibited terminal neuronal maturation. In comparison, neurons derived from heterogeneous populations within neural aggregates appeared as fully mature with a dense neurite network and punctuated vGlut2 expression within presynaptic vesicles. Also those NPCs that had migrated away from adherent neural aggregates maintained their ability to generate a synchronously oscillating neuronal network, even if they were separated from adherent aggregates, dissociated and re-plated.

**Conclusion:** These findings suggest that the complex environment within niches and aggregates of heterogeneous neural cell populations support the generation of fully mature neurons and functional neuronal networks from ES cell-derived neural cells. In contrast, homogeneous ES cell-derived NPCs within monolayer cultures exhibited an impaired functional neuronal maturation.



## Background

Functional biological neuronal networks *in vitro* can be derived from primary tissue-derived neurons and represent populations of synaptically interconnected cells capable of generating synchronous electrophysiological activity [1-6]. Electrophysiological recordings of entire neuronal networks can be achieved by microelectrode arrays (MEAs) which can detect electrophysiological activity of spatially distributed neuronal populations by multi-electrode recordings over several weeks or months [5,7-10]. *In vitro* generated neuronal networks that represent the basic principle for brain activity can be used to analyze the electrophysiological development and quality of interconnected neuronal populations of different cell sources as well as their reactions to pharmacologically active compounds. The formation of functional neuronal networks requires fundamental properties of neural populations such as the ability to exhibit adequate neurite outgrowth, synaptogenesis, neurotransmitter production and release, action potentials as well as the generation of glial cells supporting neuronal functions. If only one of these fundamental properties is absent, the function of neuronal networks might be heavily impaired or even entirely blocked.

Recently, we and others demonstrated that also embryonic stem (ES) cell-derived neural precursor populations are able to generate functional neuronal networks [11,12]. We illustrated that the development of an ES cell-derived neuronal network is characterized by distinct stages of specific electrophysiological activity that finally results in spatially distributed synchronously oscillating bursts [11]. The rationale for using ES cell-derived instead of primary tissue-derived neural populations is the increased homogeneity and controllability of *in vitro* generated functional neuronal networks whose reactions, for instance, to different pharmacological compounds strongly depend on the standardization of the cell culture. Furthermore, the possibility of measuring the electrophysiological function of *in vitro* generated neuronal networks permits to verify the quality of different precursor-derived neuronal populations prior to transplantation within the scope of regenerative medicine.

In recent years, the so called niche-independent development of neural precursor cells in monolayer cultures instead of precursor development within niches of aggregated cells of different developmental stages, also called neurospheres, was regarded as the most efficient way to synchronize and control neural precursor cell development *in vitro*. In order to improve standardization and homogeneity of ES cell-derived neuronal networks, we also applied the niche-independent protocols [13] for monolayer neural precursor cells (MNPs) that were generated initially from serum-free, floating cultures of embry-

oid body-like aggregates (SFEBs). We were able to produce highly homogeneous cultures of MNPs that adopted a radial glia-like cell stage and differentiated under controlled conditions into astrocytes and oligodendrocytes as well as mature NeuN<sup>+</sup> neurons that also expressed GABA or vesicular-glutamate-transporter-2 (vGlut2). While dense MNP cultures, differentiated for at least 28 days, were able to generate spontaneously spiking neurons as expected, they were, however, not able to generate functional, synchronously oscillating neuronal networks as demonstrated by the MEA technology. Instead, we could show that the development of functional neuronal networks was reliably possible when heterogeneous neural cell populations derived from aggregated neural precursor cell-enriched SFEB (nSFEB) niches were used. As comparison of the neuronal morphology between MNP- and nSFEB-derived neuronal populations revealed shortcomings of MNP-derived neurons with respect to neurite morphology and maturity of glutamatergic neurons, we speculate that heterogeneous neural cell populations within neural aggregates provide factors which support the generation of functional neuronal networks.

## Methods

### Neural differentiation of ES cells

The ES cell lines SV-129 (ATCC, Millipore, Germany), R1 [14] and an ES cell line constitutively expressing enhanced green fluorescent protein (EGFP) derived from transgenic C57BL/6J mice ubiquitously expressing EGFP under the influence of the chicken  $\beta$ -actin promoter [15] were used in this study. Undifferentiated ES cells were grown under feeder-deprived conditions in the presence of 1,000 U/ml leukemia inhibitory factor (LIF, Chemicon, Temecula, CA, USA) and 20% fetal bovine serum (FBS, HyClone, Thermo Fisher Scientific, Germany) in ES cell medium described elsewhere [16]. Neural differentiation of immature ES cells was performed by modified protocols according to Watanabe (2005) and Nat (2007). Briefly, ES cell colonies were harvested without dissociation and replated on bacterial dishes (Greiner, Germany) in ES cell medium containing 10% FBS without LIF [17]. After one day, free-floating embryoid bodies had developed and were re-plated in neural induction medium (NIM) consisting of DMEM/F12 and neurobasal medium (1:1) (both from Gibco-BRL), 2 mM Glutamax (Gibco-BRL) and N2 supplement according to Johe and colleagues [18] as well as B27 supplement (Gibco-BRL). After 7 days, serum-free, floating cultures of embryoid body-like aggregates (SFEB) had developed consisting predominantly of neural precursor cells [19-21]. SFEBs were used to generate neural precursor cell-enriched SFEBs (nSFEBs) or adherently growing monolayer neural precursors (MNP).

For the generation of nSFEBs, free-floating SFEBs were cultivated for 7 to 14 days in the presence of neural prolifer-

ation medium (NPM) consisting of DMEM/F12, 2 mM Glutamax, fibroblast growth factor-2 (FGF-2), epidermal growth factor (EGF) (20 ng/ml each, PeproTech) and N2 supplement.

For the generation of secondary neural cell populations derived from nSFEBs, nSFEBs were plated on laminin coated dishes and kept under the influence of EGF and FGF-2 for 5 to 7 days. During that time a dense cell layer of mixed neural cells had spread out from the nSFEB aggregates. Entire populations including the compact nSFEB aggregates and the population that had spread out were detached by accutase (Chemicon, Germany) treatment for 20 minutes at 37 degrees, slightly triturated while leaving the nSFEB aggregates intact and then transferred to conical tubes and allowed to sediment for 10 minutes. Single cells within the supernatant, referred to as secondary neural cell populations derived from nSFEBs (SNPs), were collected and transferred on PDL/laminin-coated substrates for further characterization.

For the generation of MNPs, SFEBs were seeded on gelatin (0,1%, Sigma-Aldrich) coated plastic dishes (Greiner) in the presence of neural stem cell expansion medium (NS-A medium, Euroclone, Milan, Italy) supplemented with modified N2 and 20 ng/ml of both EGF and FGF-2. After 46 days in culture, cells migrating away from attached SFEBs were selectively enriched by multiple passages according to Conti and colleagues (2005).

#### **Differentiation of nSFEBs, SNPs and MNPs**

For propagation, free-floating nSFEBs were passaged once a week under the influence of EGF and FGF-2. MNPs were cultivated on gelatin coated dishes in NS-A medium under the influence of EGF and FGF-2.

For differentiation, nSFEBs (510 aggregates/100  $\mu$ l), dissociated SNPs or MNPs (40.000 cells to 80.000 cells/100  $\mu$ l) were seeded on poly-D-lysine (PDL, 15  $\mu$ g/ml, Sigma) and laminin (15  $\mu$ g/ml, Sigma) coated glass coverslips or microelectrode arrays (Multi Channel Systems, Reutlingen, Germany). For successful long-term attachment of cells on MEAs, PDL coating was performed for 1 day and laminin coating for 5 days at 4 °C. To improve cell survival and induce a latent neurogenic program [22], cells were kept for further 610 days after plating under the influence of FGF-2 only, before also this growth factor was gradually removed from the medium to induce terminal differentiation. For long-term culture, ES cell-derived neuronal networks were kept in DMEM/F12 supplemented with N2, B27 and Glutamax.

#### **Immunocytochemistry and quantification**

For immunocytochemical investigations, cultured cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.3

and fixed for 15 min in 4% paraformaldehyde before incubation with 1% normal goat serum (NGS, Sigma) in PBS for one hour. Primary antibodies were monoclonal mouse antibodies to  $\beta$ tubulin III (1:750, R&D Systems), glial fibrillary acidic protein (GFAP, 1:1000, DAKO) nestin (1:750, Chemicon), myelin basic protein (MBP, 1:1000, Chemicon), NeuN (1:500, Chemicon), synaptophysin (1:100, Sigma), GABA (1:1000, Sigma) and vesicular glutamate transporter 2 (vGlut2, 1:10000, Chemicon). They were applied at 4 °C over night. After washing in PBS, appropriate secondary antibodies coupled to Cy2, Cy3 or Cy5 (1:750, Dianova, Hamburg, Germany) were applied for one hour at room temperature. Cell cultures were counterstained for one minute with 4',6-Diaminodino-2-Phenylindol (DAPI, 2  $\mu$ g/ml, Serva) to visualize cell nuclei. Images were collected with a confocal-laser scanning microscope (LSM 510 Zeiss, Germany).

For quantification of neurons, astrocytes or oligodendrocytes, percentages of NeuN<sup>+</sup>, GFAP<sup>+</sup> or MBP<sup>+</sup> cells from all DAPI<sup>+</sup> cells were counted with "Nucleolus Counter Plugin" and "Cell Counter Plugin" provided by ImageJ software.

#### **Microelectrode array recordings**

To measure the electrophysiological activity of nSFEB-, SNP- and MNP-derived neurons, microelectrode arrays (MEAs) were used with a square grid of 60 planar Ti/TiN electrodes (30- $\mu$ m diameter, 200- $\mu$ m spacing) and an input impedance of <50 k $\Omega$  according to the specifications of the manufacturer (Multi Channel Systems, Reutlingen, Germany). Signals from all 60 electrodes were simultaneously sampled at 25 kHz, visualized and stored using the standard software MC\_Rack provided by Multi Channel Systems. Spike and burst detection was performed off-line by custom-built software (Result, Düsseldorf, Germany). Individually for each channel, the threshold for spike detection was set to 6.2 standard deviations (SDs) of the average noise amplitude during a 10% "learning phase" at the beginning of each measurement. An absolute refractory period of 4 ms and a maximum spike width of 2 ms were imposed on the spike detection algorithm. All spike waveforms were stored separately and visually inspected for artifacts. Burst detection was performed individually for each electrode by comparing the actual temporal clustering of spikes with a Poisson process of independently occurring spikes at the same mean firing rate (null hypothesis). Given the mean firing rate (MFR) of each electrode, the probability  $P(N, \Delta t | \text{MFR})$  of finding at least N spikes within the time span  $\Delta t$  was calculated using the Poisson distribution. An observed cluster of  $N > 3$  spikes occurring within  $\Delta t$  was considered as burst, if its Poisson probability  $P(N, \Delta t | \text{MFR})$  was below 0.005. Note that although bursts frequently occurred as

population events, i.e. synchronized across many electrodes, they were detected separately for each electrode allowing for different mean firing rates. Bursts were also verified for plausibility by visual inspection. For the quantification of firing synchrony across two electrodes spikes were collected in 10 ms wide bins. Bins were then dichotomized to contain either zero spikes or at least one spike. For two electrodes (1, 2) with  $s_1$  ( $s_2$ ) bins containing spikes on electrode 1 (2),  $c_{12}$  bins with coincident spikes on both electrodes, and a total of  $N$  bins in the recording, there is an expected proportion  $p_{exp} = ((N - s_1) \cdot (N - s_2) + s_1 \cdot s_2) / N^2$  of coincident bins (both either empty or with coincident spikes), if firing occurred independently on both electrodes. Cohen's kappa statistic  $\kappa$  then captures the excess part of the proportion of observed coincident bins  $p_{obs}$  over the expected proportion  $p_{exp}$ :  $p_{obs} = p_{exp} + \kappa \cdot (1 - p_{exp})$  [23]. Kappa values lie in the range  $-p_{exp} / (1 - p_{exp})$  to +1. The average kappa of all electrode pairs with a firing rate of at least 50 spikes per minute was calculated as measure of overall synchrony of a recording.

#### Statistical analysis

MEA recordings for the different groups (nSFEB, SNP, MNP) were repeated at least 10 times for each group with at least 3 independent cell cultures. To verify electrophysiological differences of aggregates, clusters and interjacent cells, at least 826 electrodes, respectively, were ascribed to the spatially different compartments of individual cultures and electrophysiologically analyzed. Data were analyzed with one way analysis of variance (Anova) followed by Bonferroni's multiple comparison test. A  $P$  value less than 0.05 (\*) or 0.01 (\*\*) was considered to be statistically significant. For quantification of cell type-specific marker expression, at least 1000 cells in three independent cultures, respectively, were counted in duplicates for each time point and were analyzed by unpaired t-test.

Data of spikes/minute and kappa values were analyzed by paired t-test. Data are presented as mean  $\pm$  standard error of means,  $n$  refers to the number of recordings. All data analyses have been performed with GraphPadPrism, version 4.0.

## Results

### **nSFEB-derived migrating progeny consists of a mixed neural cell population**

In contrast to mere neural selection protocols [16], we primarily pre-differentiated ES cells by neural induction. For this, embryoid bodies were maintained in ES cell medium without LIF for only one day before cells were transferred to the neural induction medium (NIM) (Figure 1a). After 7 days in NIM, serum-free, floating cultures of embryoid body-like aggregates (SFEBs) had developed which predominantly consisted of neural stem and progenitor cells as well as residual undifferentiated ES cells [13,19-21]. For

further purification, SFEBs were cultivated as free-floating aggregates in neural proliferation medium (NPM) under the influence of EGF and FGF-2 and passaged at least 23 times whereupon neural precursor cell-enriched SFEBs (nSFEBs) had developed.

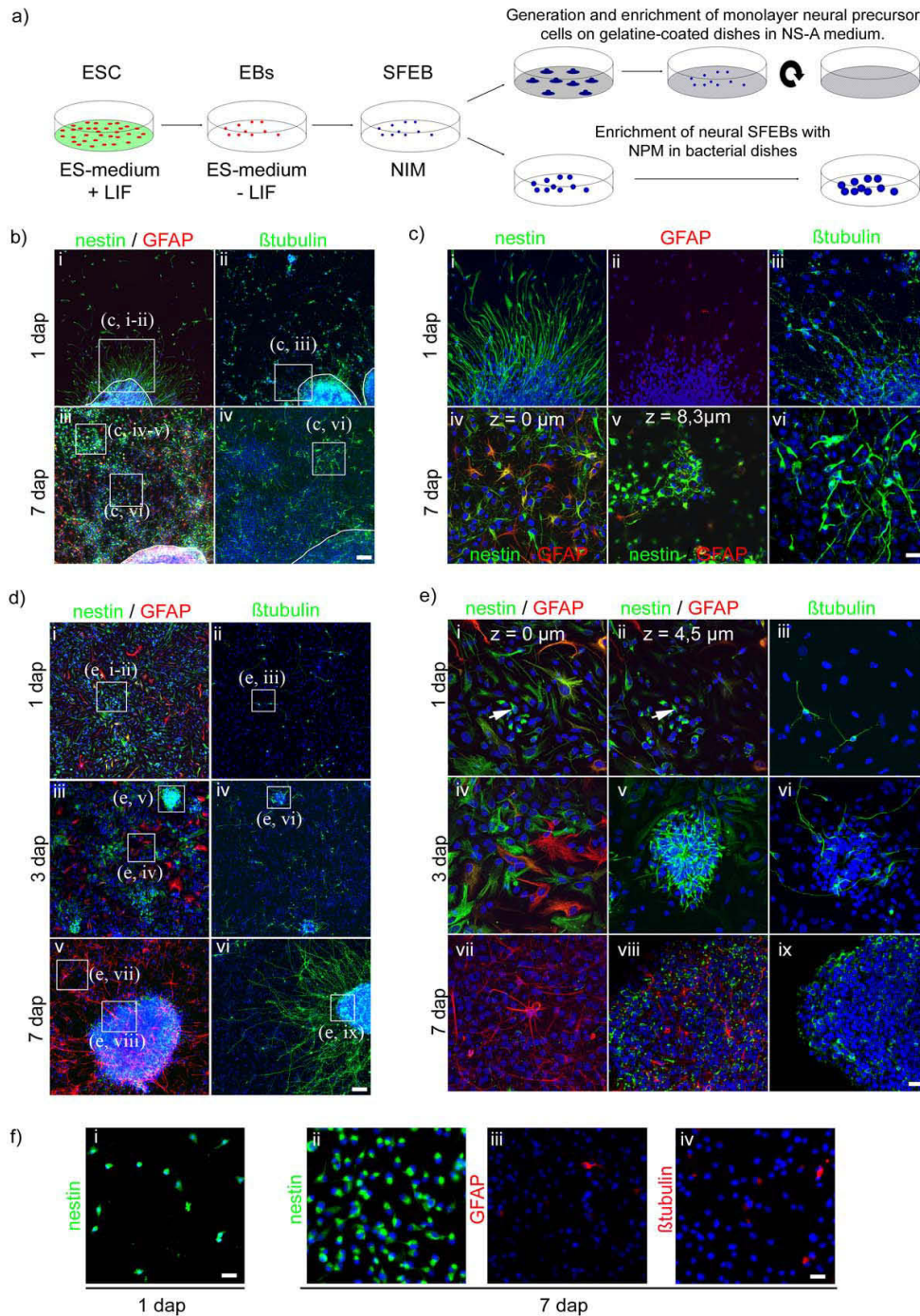
In accordance to previous publications [13,21], one day after plating nSFEBs on laminin coated substrates, two different cell populations were observed that migrated radially, leaving the edges of the adherent nSFEB aggregates. The first population displayed an elongated-flat morphology and most of these cells were nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup>, while only very few of them were nestin<sup>-</sup>/GFAP<sup>+</sup> (Figure 1b, c). The second population was bipolar and round shaped and predominately  $\beta$ tubulin<sup>+</sup> (Figure 1b, c).

Seven days after plating, the elongated-flat cell population had migrated a considerable distance away from the edges of the nSFEB aggregates and generated a flat cell layer of nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup>, nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> and nestin<sup>-</sup>/GFAP<sup>+</sup> cells (Figure 1b, c). Interestingly, in addition to the flat cell layer and the  $\beta$ tubulin<sup>+</sup> population (Figure 1c, iv and 1vi), secondary cell clusters appeared on top of the flat cell layer (Figure 1c, v). These secondary clusters consisted of round nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup> cells that were smaller than the elongated-flat cells. In addition, the nestin immunoreactivity in round nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup> cells was considerably stronger in comparison to nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup> and nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> elongated-flat cells (Figure 1b, c).

After further cultivation in the presence of growth factors, secondary clusters of round nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup> cells gave rise to larger structures that we termed secondary neural aggregates (Figure 1d, v, vi). They comprised  $\beta$ tubulin<sup>+</sup> neurons, nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup> cells and nestin<sup>-</sup>/GFAP<sup>+</sup> astrocytes (Figure 1e, viii, ix). The flat cell layer of migrating elongated cells and the secondary neural clusters and aggregates were referred to as the secondary neural cell population (SNP), which consisted of a mixed neural phenotype. Most importantly, we and others [21] were not able to detect contractile tissue indicative for mesodermal differentiation or epithelia like cells indicative for endodermal differentiation within the SNP during the first 7 days after plating nSFEBs under the influence of FGF-2 or EGF/FGF2 (data not shown). Residual non-neural cells, however, were detected within nSFEBs and also within the SNP at later time points (>14 days after plating) during terminal differentiation (data not shown).

### **The secondary neural cell populations (SNPs) derived from plated nSFEBs can selectively be harvested**

To isolate SNPs derived from primary nSFEB aggregates on a laminin substrate at early time points and thus to eliminate non-neural cells determined to become, for instance, contractile tissue or epithelial-like cells, we first



**Figure 1**  
**Phenotype of nSFEB-, SNP- and MNP-derived neural cell populations.** Schematic illustration of the generation of nSFEBs and MNPs from ES cells (a). Low magnification overview (b; d) and regions of interests (ROIs) presented at higher magnifications (c; e; f) with nestin<sup>+</sup>, GFAP<sup>+</sup> or  $\beta$ tubulin<sup>+</sup> cells in adherent nSFEB (b; c), SNP (d; e) or MNP (f) cultures at different time points indicated by dap (days after plating) are given. Adherently growing nSFEB aggregates are delineated by a white line (b). White boxes indicate ROIs in b and d which were presented at higher magnification in e and c (brackets indicate the corresponding ROI). In c, iv + v and e, i + ii ROIs are illustrating the same region at different z-levels (the z-level given in  $\mu\text{m}$ ), respectively.

detached the entire cell population including primary nSFEB aggregates and SNPs and separated those populations by gentle trituration and sedimentation of nSFEB aggregates. The SNPs were then again dissociated and plated on a laminin coated substrate and characterized by immunocytochemistry and MEA recordings.

One day after plating dissociated SNPs, a mixed neural cell population could be observed which consisted of elongated-flat nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup>, nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup>, nestin<sup>-</sup>/GFAP<sup>+</sup> cells and processes-bearing  $\beta$ tubulin<sup>+</sup> cells (Figure 1d, e). Already at this early time, we again observed secondary clusters similar to those found in nSFEB cultures. They consisted of small round nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup> cells which were located on top of the elongated-flat neural cells (Figure 1e, i, ii). Three days after plating dissociated SNPs, secondary clusters adopted a rosette-like structure composed of nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup> and  $\beta$ tubulin<sup>+</sup> cells with radially extending neurites. Interestingly, secondary clusters did not exhibit GFAP<sup>+</sup> cells yet (Figure 1e, v + vi). Seven days after plating dissociated SNPs, secondary clusters gave rise to larger secondary neural aggregates, similar to those observed within nSFEB cultures. They were composed of nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup>, nestin<sup>-</sup>/GFAP<sup>+</sup> cells and, particularly at the edges,  $\beta$ tubulin<sup>+</sup> neurons (Figure 1e, viii + ix). At the same time, the cell population in between secondary clusters or aggregates comprised nestin<sup>-</sup>/GFAP<sup>+</sup> flat cells (Figure 1d, v; 1e, vii) and  $\beta$ tubulin<sup>+</sup> neurons (Figure 1d, ii, iv; e, iii). Importantly, all independently predifferentiated SNP cultures, no formation of contractile tissue was observed.

#### **MNPs consist of a pure radial glia-like cell population**

In contrast to neural aggregate cultures (nSFEB or SNP), MNPs were cultivated on gelatin-coated substrates in neural stem cell medium (NS-A) supplemented with EGF and FGF-2 with 23 passages per week (Figure 1a). As revealed by immunocytochemical analyses, all MNPs were homogeneously nestin<sup>+</sup> (Figure 1f) Pax6<sup>+</sup>/Vimentin<sup>+</sup>/RC2<sup>+</sup> (data not shown). After cultivation of MNPs for 7 days on a laminin substrate under the influence of FGF-2, few cells expressed GFAP or  $\beta$ tubulin (Figure 1f, iiiv). This indicated that the gelatin substrate in combination with EGF and FGF-2 was able to keep MNPs in an immature radial glial state and that a laminin substrate together with FGF-2 alone was not able to completely prevent differentiation.

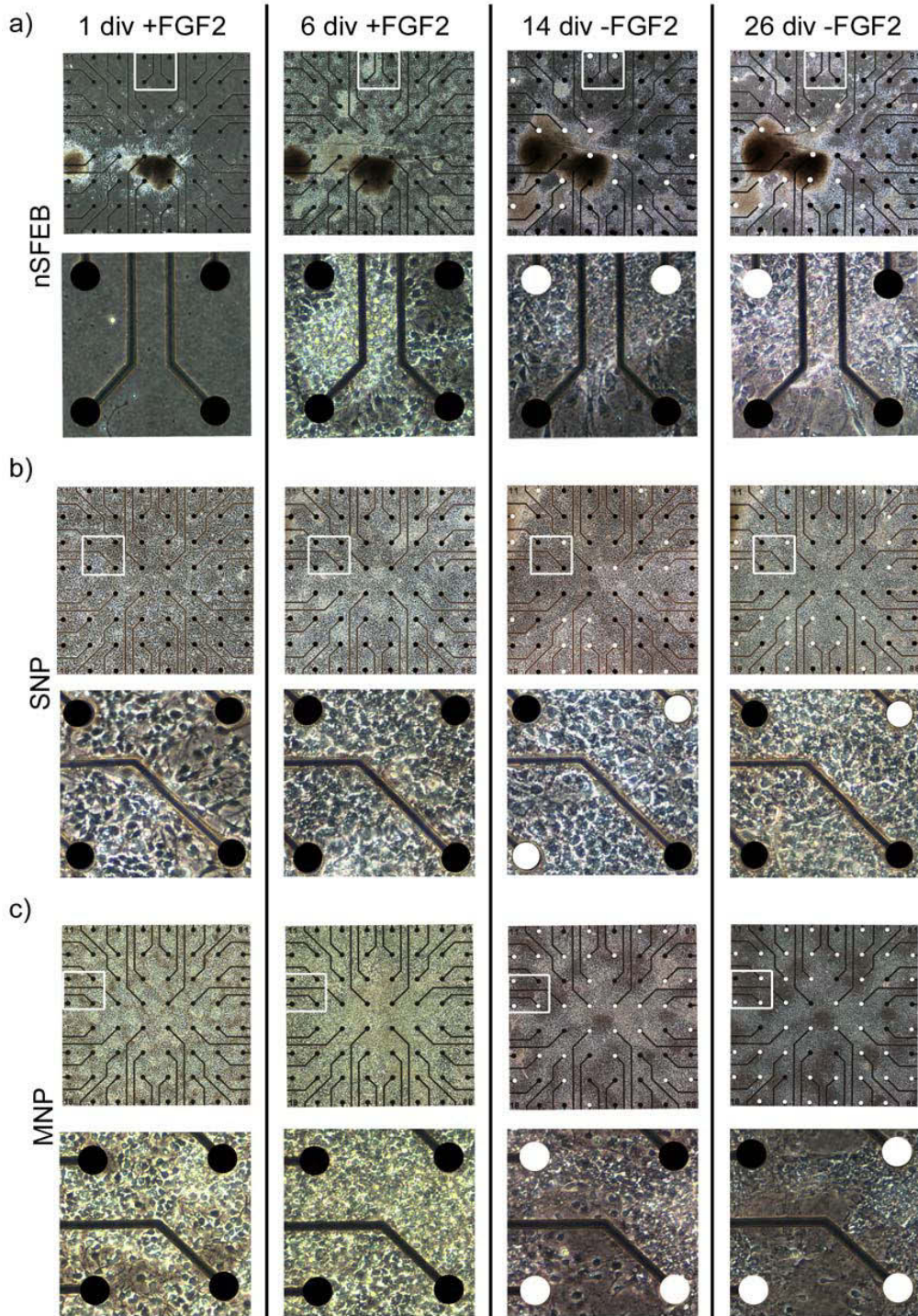
#### **nSFEB- and SNP-, but not MNP-derived cells are able to generate synchronously oscillating neuronal networks**

To determine if nSFEB-, SNP- and MNP-derived neural cells are able to generate functional neuronal networks, we plated nSFEBs (510 aggregates), SNPs or MNPs (48 × 10<sup>4</sup> cells/100  $\mu$ l) on microelectrode arrays (MEAs). After a proliferation period of about one week under the influence of FGF-2, this growth factor was gradually removed

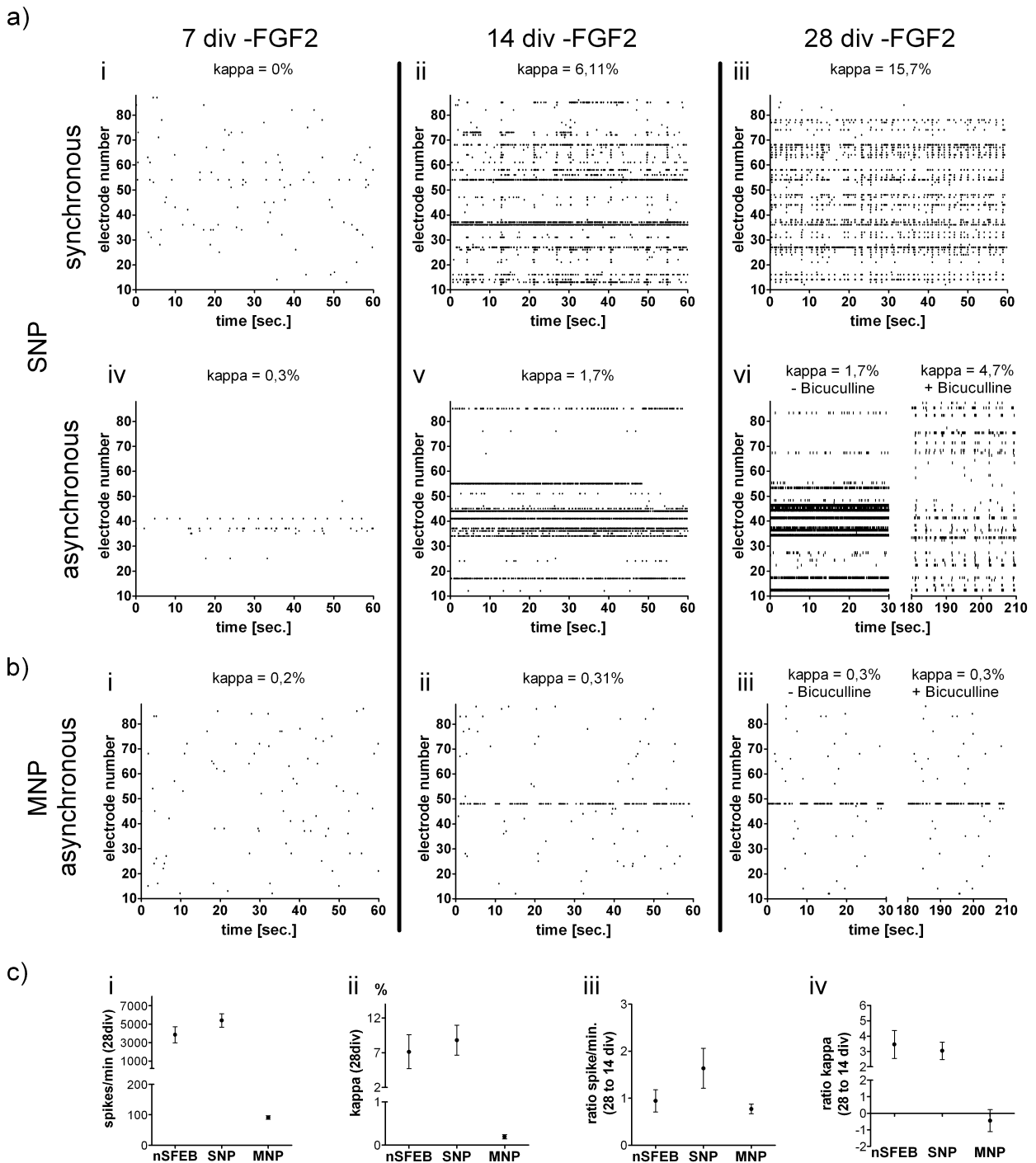
to initiate terminal differentiation (Figure 2). After withdrawal of FGF-2, MEA recordings were performed every 2 to 3 days over a time period of 412 weeks. Differentiation without FGF-2 for at least 14 days led to the appearance of active (spike detecting) electrodes in all different approaches (Figure 2ac). In accordance with previously published results [11], the functional development of nSFEB- or SNP-derived neuronal networks could be divided into three distinct stages (Figure 3). Since MEA recordings of nSFEB and SNP cultures revealed no detectable differences between these two cultures, we only exemplarily illustrated spike raster plots (SRP) of SNP cultures. During the first week after initiating the differentiation, spontaneous spiking activity was observed (stage 1; Figure 3a, i + iv; b, i). During the second week after initiating the differentiation, also spikes organized in trains or bursts were detected on an increased number of MEA electrodes (stage 2). From 24 weeks onwards after initiating the differentiation, the activity patterns of nSFEB and SNP cultures either progressed towards synchronously oscillating bursts (stage 3, Figure 3a, ii + iii) or remained unsynchronized within stage 2 (Figure 3a, v + vi). Some nSFEB or SNP cultures that did not spontaneously progress towards synchronous stage 3 activity were then treated with bicuculline, a GABA-A receptor antagonist which is known to elicit synchronous stage 3 network activity in previously non-synchronously active stage 2 populations provided morphological prerequisites are given. Interestingly, bicuculline robustly converted non-synchronous stage 2 activity towards synchronous stage 3 activity in all 11 independent nSFEB and SNP-derived neuronal cultures (Figure 3a, vi).

We then verified the functional activity of MNP-derived neuronal populations. While electrodes abundantly detected spontaneous spike activity and trains of spikes commencing 14 days after initiating the differentiation, synchronous bursts were absent during an observation time of up to 3 months in 20 independent MEA cultures (Figure 3c). Importantly, also the application of bicuculline did not elicit synchronous network activity in MNP-derived neuronal populations (Figure 3b, iii). As also the seeding density of neuronal populations is known to be of importance with respect to functional network generation [7,24,25] we plated nSFEB-, SNP- and MNP-derived neural cell populations at varying seeding densities. Similar to primary tissue-derived neuronal networks [7,24,25] higher seeding densities of nSFEB or SNP cultures changed the development of synchronous neuronal networks. However, varying seeding densities did not improve the functional activity of MNP-derived cultures.

Comparison of mean activity levels (spikes per minute) and degrees of network synchrony (kappa values) of nSFEB-, SNP- and MNP-derived neuronal networks



**Figure 2**  
**Development of neuronal activity of nSFEB, SNP or MNP cultures.** Overview (a; b; c; upper panel) and detailed (a; b; c; lower panel) phase-contrast images of different cultures on MEAs in the presence (+FGF2) and after the removal (-FGF2) of FGF2. White-labeled electrodes represent electrodes that detect spontaneous spikes and black-labeled electrodes detect no spikes. White boxes in upper panels indicate regions which are presented at higher magnification in the lower panels. Electrode diameter = 30  $\mu\text{m}$ .



**Figure 3**  
**Spike raster plots (SRPs), mean activity levels and kappa values.** Examples of SRPs and corresponding kappa values illustrate the temporal and spatial development of spikes detected by electrodes (vertical axis) over a time period of 60 seconds (horizontal axis) in different cultures (**a, b**) and different time points after the removal of FGF2. The effect of 50  $\mu$ M bicuculline is illustrated in right panels of **a, vi** and **b, iii**. Mean activity levels (spikes/minute) and the degree of synchronous bursting (kappa values) at 28 div are illustrated for different cultures (**c, i + ii**). The development of mean activity levels and synchronous bursting between 14 and 28 div is given as ratios (**c, iii + iv**).

revealed major differences. Twenty-eight days after initiation of differentiation, the mean spike rates in nSFEB or SNP cultures were 42-fold or 52-fold higher, respectively, than in MNP cultures (Figure 3c, i). Furthermore, kappa values at this point in time were clearly indicative of synchronous network activity in nSFEB and SNP cultures. Kappa values in MNP cultures were expectedly low suggesting asynchronous activity. This is in line with the comparably low overall activity levels of MNP cultures that were hardly consistent with synchronous bursting (Figure 3c, ii).

To measure developmental changes of network activity between 14 and 28 days after initiating the differentiation, spike rate ratios (spike rates at 28 days/14 days) or kappa ratios (kappa values at 28 days/14 days) were calculated for nSFEB-, SNP- or MNP-derived network activity. While spike rate ratios revealed no major differences between groups, kappa ratios suggested an increase in synchrony of network activity merely of nSFEB or SNP cultures (Figure 3c, iii + iv).

#### **Percentages of active electrodes in nSFEB- and SNP-derived populations are regionally different**

An overview of the distribution of active electrodes in different ES cell-derived neural population is given in figure 2 with active electrodes depicted in white and inactive electrodes in black. In the present study, most electrodes that detected spike activity (active electrodes) recorded multiphasic spikes, suggesting a somatic origin of those signals [4].

As nSFEB and SNP cultures exhibited a heterogeneous spatial distribution of cells with primary nSFEB aggregates (only in nSFEB cultures), secondary neural aggregates (in nSFEB and SNP cultures) and the interjacent cell population consisting of a flat cell layer (Figure 2), we accordingly analyzed the spatial distribution of active electrodes which were participating in synchronous burst activity.

We observed that most active electrodes were localized at the edges of primary nSFEB or secondary neural aggregates (edges:  $75\% \pm 14.4\%$  vs. centers:  $7.2\% \pm 7.4\%$ ,  $p < 0.001$ ) and that fewer active electrodes were localized within the interjacent cell population (interjacent cell population:  $25.8\% \pm 10.6\%$ ).

#### **Neural aggregate and MNP cultures contain considerable numbers of neurons and glial cells**

To analyze if the differences in mean activity levels and kappa values detected between neural aggregate cultures (nSFEB or SNP) and MNP cultures were caused by varying numbers of neurons, astrocytes or oligodendrocytes, we quantified total numbers of these cell types within neural aggregate or MNP cultures at 7 or 28 days after initiating

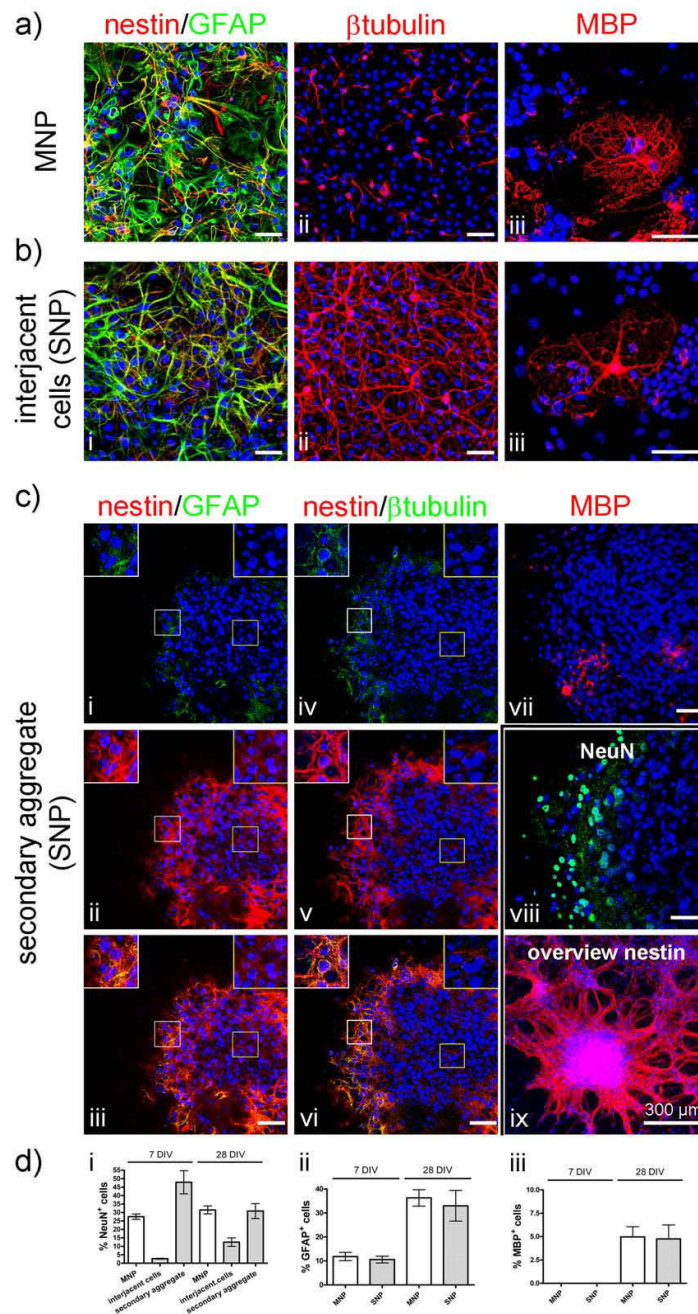
the differentiation (Figure 4). Since neural aggregate cultures comprised neural aggregates and interjacent cells, we analyzed these cultures accordingly. To quantify different cell types within a fairly pure population of neural cells, we spared analyzing primary nSFEB aggregates as several of these heterogeneous structures contained considerable numbers of non-neural cells like e.g. cardiomyocytes or epithelial cells which rendered a stringent quantification impossible. Since cell type-specific markers like  $\beta$ tubulin, GFAP or MBP detect cytoplasmic structures and cellular processes, it was not possible to reliably quantify cells positive for those markers within densely packed secondary neural aggregates even by laser scanning microscopy. Quantification of those markers in MNP cultures or within the interjacent cell population in neural aggregate cultures was reliable. Nevertheless, to quantify at least neuronal numbers within secondary aggregates, we applied NeuN immunocytochemistry which specifically detects neuronal nuclei. By means of this marker, also densely packed cells within secondary neural aggregates could reliably be quantified. For better comparison of the quantitative results, NeuN was applied as the quantitative neuronal marker in different groups instead of  $\beta$ tubulin.

Both MNP and neural aggregate cultures comprised nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup>, nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup>, and nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> cells with diverse morphology, process-bearing  $\beta$ tubulin<sup>+</sup> neurons and multi-branched MBP<sup>+</sup> oligodendrocytes at 28 days after the initiation of differentiation (Figure 4a, b). After initiating the differentiation by gradual withdrawal of FGF-2, the homogeneous population of radial glia-like MNPs differentiated into equally distributed  $\beta$ tubulin<sup>+</sup> neurons, GFAP<sup>+</sup> astrocytes and MBP<sup>+</sup> oligodendrocytes (Figure 4a). Laser scanning microscopy revealed that secondary neural aggregates comprised a core and edge region (Figure 4c). The core region was composed of mainly nestin<sup>+</sup> cells (Figure 4c, i-vi; yellow box), whereas edges appeared to harbour higher numbers of GFAP<sup>+</sup>,  $\beta$ tubulin<sup>+</sup> and few MBP<sup>+</sup> cells (Figure 4c, i-vi; white box).

Seven days after initiating the differentiation,  $27.52\% \pm 1.547\%$  of all MNP-derived cells were NeuN<sup>+</sup> neurons. The number of neurons remained stable until 28 days after initiating the differentiation ( $31.52\% \pm 2.340\%$ , Figure 4d, i).

Numbers of NeuN<sup>+</sup> neurons in neural aggregate cultures were separately quantified within secondary neural aggregates and interjacent cells. Similar to the distribution of  $\beta$ tubulin<sup>+</sup> cells, we could barely find any NeuN<sup>+</sup> cells within centers of secondary aggregates, in comparison to the edges where we found  $47.9\% \pm 6.8\%$  NeuN<sup>+</sup> neurons at 7 days after initiating the differentiation (Figure 4c, viii). At 28 days after initiating the differentiation, percentages of NeuN<sup>+</sup> cells tended to decrease at the edges





**Figure 4**  
**Neuronal and glial differentiation of neural aggregate and MNP cultures.** Images illustrate the composition of MNP or neural aggregate (nSFEB or SNP) cultures (**a-c**). Both cultures comprise nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup>, nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup> and nestin<sup>-</sup>/GFAP<sup>+</sup> (**a, i; b, i; c i-iii**),  $\beta$ tubulin<sup>+</sup> (**a, ii; b, ii; c, iv-vi**) and MBP<sup>+</sup> cells (**b, iii; c, iii; d, vii**). Optical slices (1  $\mu$ m) illustrate the morphology and localisation of nestin<sup>+</sup>,  $\beta$ tubulin<sup>+</sup>, GFAP<sup>+</sup>, NeuN<sup>+</sup> and MBP<sup>+</sup> cells within the core (yellow boxes) or edge (white boxes) region of secondary neural aggregates (**c, i-vii**). Regions of interest indicated by boxes are illustrated at higher magnifications (**c, i-vi**). Note, for visualisation of MBP<sup>+</sup> multi-branched oligodendrocytes a set of optical slices were stacked (**c, vii**). Low-magnification image of nestin<sup>+</sup> cells in neural aggregate cultures containing secondary neural aggregates and the interjacent cell population (**c, ix**) Scale bar: 75  $\mu$ m. Diagrams illustrate percentages of NeuN<sup>+</sup> neurons (**d, i**), GFAP<sup>+</sup> astrocytes (**d, ii**) or MBP<sup>+</sup> oligodendrocytes (**d, iii**) within neural aggregate or MNP cultures at the indicated days *in vitro* (div).

towards  $30.8\% \pm 4.4\%$  (Figure 4d, i). The interjacent cells in between secondary aggregates contained only  $2.7\% \pm 0.3\%$  NeuN<sup>+</sup> neurons at 7 days after initiating the differentiation. After 28 days, percentages of NeuN<sup>+</sup> neurons tended to increase towards  $12.5\% \pm 2.5\%$  (Figure 4d, i). This quantitative constellation suggests either a dynamic migration of cells between aggregates and the interjacent area or ongoing neurogenesis.

Considerable numbers of nestin<sup>+</sup> cells within the centers of secondary aggregates indicate that antibodies do have access to this dense cellular structure (Figure 4c ii, v, iii, vi).

Thus, both neural aggregate (nSFEB or SNP) and MNP cultures contained considerable numbers of neurons. While NeuN<sup>+</sup> neurons in MNP cultures were evenly distributed, NeuN<sup>+</sup> neurons in neural aggregate cultures were predominantly located at the edges of secondary neural aggregates and to a lower percentage within the interjacent population. However, also those regions within neural aggregate cultures that showed lower neuronal percentages (interjacent population) were found to be functionally integrated within synchronous network activity (see above), suggesting that not only the mere number of neurons within cultures is responsible for different degrees of electrophysiological activity.

As it is known that astrocytes are able to regulate synaptogenesis, neurite outgrowth and neuronal maturation [26,27], and that myelinating oligodendrocytes impact on action potential propagation, we also analyzed the numbers of GFAP<sup>+</sup> astrocytes and MBP<sup>+</sup> oligodendrocytes within neural aggregate and MNP cultures. As described above, GFAP<sup>+</sup> or MBP<sup>+</sup> cells were found predominantly within the interjacent cell population and at the edges of secondary neural aggregates (Figure 4b, iii; c, i, vii). While a reliable quantification of GFAP<sup>+</sup> or MBP<sup>+</sup> cells within the densely packed edges of secondary aggregates was not possible, we found that the interjacent cells showed no significant differences in percentages of GFAP<sup>+</sup> astrocytes or MBP<sup>+</sup> oligodendrocytes in comparison to MNP cultures at 7 or 28 days after initiating the differentiation (Figure 4d, ii). In contrast to MNP cultures, the distribution of cells within neural aggregate cultures was not homogeneous limiting the validity of a quantitative comparison.

#### **Neural aggregate and MNP cultures differentiate into neurons positive for GABA or vGlut2**

As differentiation into inhibitory GABAergic and excitatory glutamatergic neurons represents a prerequisite for the generation of functional neuronal networks, we immunocytochemically verified the expression of GABA and vGlut2 in neural aggregate (nSFEB or SNP) and MNP cultures after 28 days of differentiation.

GABA<sup>+</sup> neurons were found in both neural aggregate and MNP cultures. However, while GABA<sup>+</sup> neurons in neural aggregate cultures extended long and ramified neurites, GABA<sup>+</sup> neurons within MNP cultures exhibited shorter and less ramified neurites (Figure 5a, i + ii). Quantification of GABAergic neurons within neural aggregate or MNP cultures, at 7 or 28 days after initiating the differentiation, showed no significant differences (Figure 5a, iii). In neural aggregate cultures, GABAergic neurons were predominantly found at the edges of neural aggregates and within the interjacent cell population.

In neural aggregate cultures, we found the typical punctuated vGlut2 staining localized on  $\beta$ tubulin<sup>+</sup> neurites, a distribution which is known to correspond to vesicular glutamate transporters on synapses. However, vGlut2 labeling in differentiated MNP cultures was localized cytoplasmically (Figure 5b). Due to the different cellular localization of vGlut2<sup>+</sup> structures in both groups, a reliable quantification of mature glutamatergic neurons that obviously do not exist within MNP cultures was not possible.

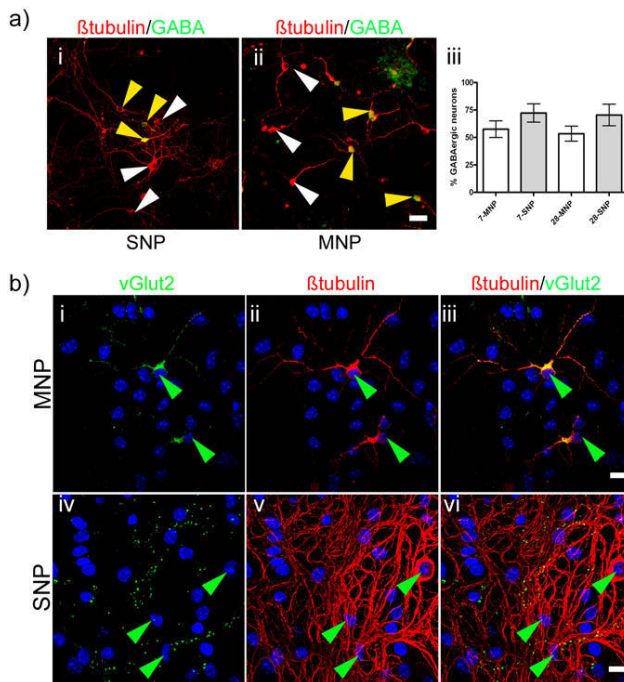
#### **Neural aggregate and MNP cultures reveal differences in neurite morphology**

Furthermore, differences in neurite morphology between neural aggregate on the one hand and MNP cultures on the other were detected (Figure 6).

While  $\beta$ tubulin<sup>+</sup> neurons within neural aggregates (Figure 6a, i) and within the interjacent cell population (Figure 6a, ii; b, i + iii) of neural aggregate cultures (nSFEB or SNP) developed a dense network of neurites as soon as 14 days after initiating the differentiation, MNP-derived neuronal populations were not able to generate a morphologically dense network of neurites (Figure 6b, ii + iv).

#### **Discussion**

We detected functional discrepancies between different ES cell-derived neuronal populations by using the MEA technology: (i) a population of homogeneous, radial glia-like cells [13] termed "monolayer neural precursors" (MNP), and (ii) a heterogeneous neural cell population comprising neural stem/progenitor cells, committed neural cells as well as mature cells like neurons and glial cells termed "secondary neural cell population" (SNP). Previous studies have demonstrated that ES cell-derived heterogeneous neural cell populations cultivated as neurospheres or as adherently growing cultures are unstable and alter their differentiation potential with time by adopting a gliogenic fate after few passages [16,28]. Whether this phenomenon is mediated by an intrinsic program or rather by the environment consisting of more committed neural cells which serve as a niche to induce enhanced glial maturation is still under debate. It was an important step forward when



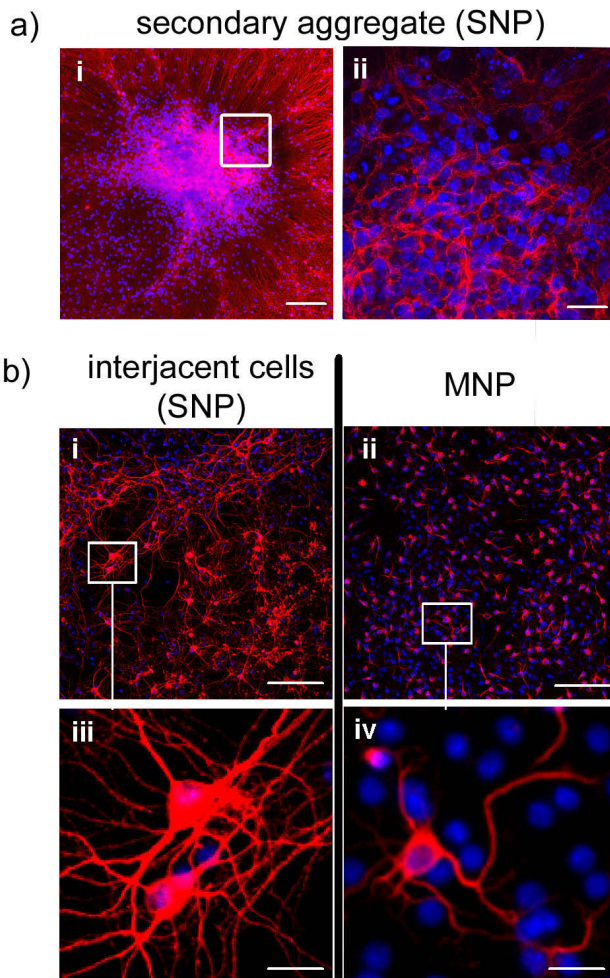
**Figure 5**  
**Morphology of GABA<sup>+</sup>- and vGlut2<sup>+</sup>-neurons in neural aggregate or MNP-cultures.** Examples of the morphology of non-GABAergic (white arrow heads) and GABAergic (yellow arrow heads) neurons (a) and the sub-cellular localization of vGlut2 (b) in MNP- (a, ii; b, i-iii) and neural aggregate-derived (a, i; b, iv-vi)  $\beta$ tubulin<sup>+</sup>neurons (green arrow heads) at 28 days after initiating the differentiation. Quantification of GABA<sup>+</sup>/ $\beta$ tubulin<sup>+</sup> cells 7 and 28 days after initiating the differentiation (a, iii) Note, the intensive  $\beta$ tubulin<sup>+</sup> cell labeling in neural aggregate cultures stems from the dense neurite network. Scale bar = 20  $\mu$ m (a) and 10  $\mu$ m (b).

new protocols were introduced allowing to generate stable ES cell-derived homogeneous radial glia-like cells which can be enriched in nearly unlimited numbers as niche-independent, adherently growing neural stem cells without losing their neurogenic fate [13]. However, we demonstrate that neurons derived from homogeneous, radial glia-like MNPs were only able to show spontaneous spike activity without generating synchronously oscillating neuronal networks. In contrast, neurons derived from heterogeneous SNPs reliably generated functional network activity with synchrony even increasing with age. Interestingly, both neural cell populations were initially generated from serum-free, floating cultures of embryoid body-like aggregates (SFEBS) before cells were split in accordance with the two different protocols. This suggests that the subsequently applied cell culture procedures were responsible for the functional differences.

#### **MNP- but not SNP-derived neurons remain within immature neuronal stages**

As both neural aggregate- and MNP-cultures differentiated into sufficient numbers of neurons, astrocytes and oligodendrocytes, the mere quantity of those cells appeared not to be responsible for differences in functional network generation. We could demonstrate that electrophysiological network activity was not limited to the edges of neural aggregates that comprised ~31% mature NeuN<sup>+</sup> neurons at 28 days after initiating the differentiation. Indeed, electrodes situated outside neural aggregates also participated in network activity although the interjacent cell population situated here contained only ~13% mature NeuN<sup>+</sup> neurons. Thus, neuronal percentages amounting to approximately 32% within dense MNP cultures at 28 days after initiating the differentiation are indicative of other causes for the missing network activity such as impaired neuronal maturity. This assumption is substantiated by the following observations.

Our morphological analyses suggest that MNP-derived neurons in general seem to remain within an immature stage as they sent out only sparsely ramified and short neurites despite a differentiation period for up to 3 months. Such delayed maturation is in accordance with patch-clamp experiments demonstrating that in MNP-derived neurons single action potentials cannot be evoked until 30 days of differentiation [13] while aggregate-based ES cell-derived neurons exhibit evoked repetitive firing already after 12 days of differentiation [17,29,30]. Furthermore, in contrast to SNP-derived neurons which exhibited a punctuated pre-synaptic vGlut2 labeling on  $\beta$ tubulin<sup>+</sup> neuronal processes, in line with a mature neuronal morphology, we demonstrated that MNP-derived neurons showed a cytoplasmic vGlut2 expression similar to immature embryonic neurons *in vivo* [31]. A proper quantification of glutamatergic neurons in different groups by means of this marker was not possible as vGlut2 antibodies labeled presynaptic structures in aggregate cultures and cytoplasmic structures in MNP cultures preventing an acceptable comparison. It has to be determined in future studies by direct labeling of glutamate, if a reliable quantification of glutamatergic neurons within aggregate or MNP cultures is feasible. However, this approach has to take into consideration that, particularly in neural precursor populations, glutamate might be of metabolic, neurotransmitter or even precursor origin [32,33]. Our morphological analyses specifically of GABAergic neurons also suggested an immature phenotype in MNP-derived cultures while aggregate-derived cultures exhibited GABAergic neurons of mature morphology with ramified and long neurites. The mere quantities of GABAergic neurons, however, were similar in both cultures. Thus, as network activity depends on the



**Figure 6**  
**Morphology of neurons within neural aggregate and MNP cultures.** Distribution of  $\beta$ tubulin<sup>+</sup> neurons within secondary neural aggregates (**a**; **b**, **i** + **iii**) and MNP cultures (**b**, **ii** + **iv**). Two weeks after the initiation of differentiation, neural aggregate-derived  $\beta$ tubulin<sup>+</sup> neurons are located within secondary aggregates (**a** overview: **i**, stacked set of optical slice at the edge indicated by white box in **i**: **ii**) and on top of flat-elongated interjacent cells (**b**, **i** + **iii**). Higher magnifications of neural aggregate- (**b**, **iii**) and MNP- (**b**, **iv**) derived  $\beta$ tubulin<sup>+</sup> neurons reveal differences in neurite length and morphology. Scale bar = 100  $\mu$ m (**a**, **i**; **b**, **i** + **ii**); 20  $\mu$ m (**a**, **i**; **b**, **iii** + **iv**).

presence of mature excitatory and inhibitory neurons, our morphological results are in line with impaired neuronal network function. To further examine neuronal populations with respect to the functional balance of inhibitory or excitatory neurotransmitter systems, we pharmacologically modulated network activity and observed that the inhibition of GABAergic transmission in neural aggregate cultures (nSFEB or SNP) transformed asynchronous stage 2 activity into synchronous stage 3 activity, whereas MNP-

derived neuronal populations remained within asynchronous stages. This functional constellation also suggests that MNP cultures miss morphological prerequisites supporting synchronous network activity.

**SNPs represent a heterogeneous neural cell population with the ability to generate functional neuronal networks in vitro**

In accordance with previous studies, we demonstrated that pure neural cell populations migrating away from neural aggregate edges on a laminin substrate can be found only within the first 7 days after attachment of nSFEBs. This period of fairly pure neural cell migration is followed by non-neural cells or residual ES cells that also migrate away from nSFEBs after further adherent cultivation [13,21]. This observation is in line with reports of residual Oct-4<sup>+</sup> cells and non-neural cells within nSFEB aggregates [19-21]. To purify neural populations, we selectively harvested migrating cells within the first week after attachment of nSFEBs by applying a sedimentation technique and termed this purified population the secondary neural cell population (SNP). We demonstrated that dissociated SNPs gave rise to neural populations that (i) were devoid of residual ES cells indicated by negative Oct-4 immunocytochemistry (data not shown), contractile tissue and epithelial-like cells in more than 130 cultures from three independently pre-differentiated ES cell populations, and (ii) generated functional neuronal network activity.

Interestingly, we showed that round nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup> cells, which were found in the periphery of adherently growing nSFEBs a few days after attachment, reorganized to neural rosette-like structures on top of a cellular monolayer consisting of nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup>, nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> and nestin<sup>-</sup>/GFAP<sup>+</sup> cells. Thereby, the cellular monolayer might contain mixed types of neural precursors and astrocytes which might serve as a neurogenic niche for neural rosette-forming nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup> cells similar to postnatal astrocytes [34,35]. This suggests that SNP-derived neural rosettes comprised neuroepithelial cells displaying several *in vivo* properties and giving rise to neural aggregates [36-40]. Laser-scanning microscopy revealed that only the edges of neural aggregates comprised higher numbers of mature neural cells (NeuN<sup>+</sup> neurons, GFAP<sup>+</sup> astrocytes or MBP<sup>+</sup> oligodendrocytes) while aggregate centres predominantly contained immature nestin<sup>+</sup> neural cells. In agreement with this, neural aggregates revealed low electrophysiological network activity within their centres (~7% of all electrodes) and high network activity at their edges (~75% of all electrodes). The development from neuroepithelial cells organised in rosette-like structures towards neural aggregates might lead to a hypothesis that immature neural cells remain within the centre of neural aggregates, virtually constituting the niche of functional neuronal progeny.

In previous studies, we demonstrated that a prolonged cultivation of ES cell-derived neural cell populations under the influence of FGF-2 resulted in the formation of substrate-adherent ES cell-derived neural aggregates (SENAs) that appeared to be similar to those secondary neural aggregates that were described in the present study. Interestingly, SENAs did not form teratomas after transplantation into an animal model of Huntington's disease [15]. We hypothesize that both, SENAs and secondary neural aggregates, can be derived from those neural rosettes by different protocols [15]. If secondary neural aggregates are also devoid of teratoma forming cells remains to be verified.

**Do MNPs exhibit intrinsically impaired neurogenesis or miss the right environment for proper neuronal maturation?**

Interestingly, we also found clustering of MNP cells at higher seeding densities, but those were devoid of rosette formation, showed an even distribution of mature and immature cells and contained only short-ramified neurons after the initiation of differentiation. It remains to be determined, if these radial glia-like cells are able to organize as neural rosettes in co-culture with astrocytes [34,35] or if they have lost the ability to recapitulate early neural stage development resulting in a restricted developmental potential. A possible reason for inhibited maturation in gelatine-cultivated monolayer precursors might also be shortcomings in the expression of extracellular matrix (ECM) molecules in comparison to the heterogeneous neural cell populations. Recent reports demonstrated that different ECM molecules such as fibronectin and laminin exert strong influences on ES cell-derived neural stem and progenitor cells resulting in the expression of different transcription factor profiles, as well as diverse morphologic and electrophysiological properties of their differentiated mature neuronal progeny [29]. Furthermore, as different subclasses of GFAP<sup>+</sup> cells are known to considerably support the electrophysiological maturation of neurons [27] and enhance or inhibit neurite outgrowth [26], it might be speculated that the different types of GFAP<sup>+</sup> cells which we found at early stages of neural aggregate development but not within homogeneous MNP cultures are important for network function. Thus, niche-independent neural development might provide a high degree of cellular homogeneity at the cost of the proper milieu to generate functionally mature neurons *in vitro*. This speculation of course will have to be substantiated by additional investigations. As the ability of precursor-derived neurons to form functional neuronal networks represents a prerequisite to properly restore functional deficits in succession to neuronal degeneration, our data are directly linked to the field of regenerative medicine.

**The MEA technology can be used to unmask functional differences of neural precursors**

The data presented here demonstrates that the MEA technology detects functional differences in neural precursor cell development that exceed the functional verification of single neurons. So far, functional neuronal analyses by intracellular recordings have shown that conventional ES cell-derived neural precursors differentiate into electrophysiologically active neurons [13,29,41]. We confirmed this by applying the MEA technology to ES cell-derived neuronal networks, suggesting that the description of synchronous network activity represents a functional feature that should be additionally taken into consideration in order to characterize properties of precursor-derived neuronal populations. Furthermore, it could be shown that multi-site extracellular recordings were able to spatially resolve functional differences within individual neural cultures that developed compact, three-dimensionally arranged cellular aggregates as well as the interjacent cellular monolayers that were evenly distributed in between those neural aggregates.

**Conclusion**

Our investigations provide evidence that ES cell-derived neural precursors derived from heterogeneous neural aggregates give rise to neurons that are able to generate functional neuronal networks between 24 weeks after initiating the differentiation *in vitro*, whereas neurons derived from a homogeneous monolayer of radial glia-like cells do not exceed the stage of uncorrelated spontaneous activity during a differentiation period of up to 12 weeks under the cell culture conditions used in the present study. If MNP-derived neuronal populations adopt a functional state under modified cell culture protocols *in vitro* or after transplantation *in vivo* remains to be determined. Nonetheless, our findings indicate that niche- and aggregate-based differentiation clearly improves the functionality of ES cell-derived neural populations *in vitro*.

**Authors' contributions**

SI participated in conceiving, conception and designing the study, carried out the acquisition, analysis, interpretation of data and drafted the manuscript. ST participated in the interpretation of data, performed the statistical analysis and critically revised the manuscript for important intellectual content. HPH and MS critically revised the manuscript for important intellectual content. MD coordinated and conceived the study, participated in its design and in the interpretation of data and critically revised the manuscript for important intellectual content. All authors read and approved the final version of the manuscript.

## Acknowledgements

We are grateful to Jessica Opatz for critically revising the manuscript, Adrian Hülsewede and Christine Holland for excellent technical support. This work was supported by the "Bundesministerium für Bildung und Forschung" (BMBF, 01GN0503).

## References

- Otto F, Görtz P, Fleischer W, Siebler M: **Cryopreserved rat cortical cells develop functional neuronal networks on microelectrode arrays.** *Journal of neuroscience methods* 2003, **128(12)**:173-181.
- Soussou WV, Yoon GJ, Brinton RD, Berger TW: **Neuronal network morphology and electrophysiology of hippocampal neurons cultured on surface-treated multielectrode arrays.** *IEEE transactions on bio-medical engineering* 2007, **54(7)**:1309-1320.
- Jun SB, Hynd MR, Dowell-Mesfin N, Smith KL, Turner JN, Shain W, Kim SJ: **Low-density neuronal networks cultured using patterned poly-L-lysine on microelectrode arrays.** *Journal of neuroscience methods* 2007, **160(2)**:317-326.
- Claverol-Tinture E, Pine J: **Extracellular potentials in low-density dissociated neuronal cultures.** *Journal of neuroscience methods* 2002, **117(1)**:13-21.
- Fromherz P, Offenhausser A, Vetter T, Weis J: **A neuron-silicon junction: a Retzius cell of the leech on an insulated-gate field-effect transistor.** *Science* 1991, **252(5010)**:1290-1293.
- Habets AM, Van Dongen AM, Van Huizen F, Corner MA: **Spontaneous neuronal firing patterns in fetal rat cortical networks during development in vitro: a quantitative analysis.** *Experimental brain research* 1987, **69(1)**:43-52.
- Chiappalone M, Bove M, Vato A, Tedesco M, Martinoia S: **Dissociated cortical networks show spontaneously correlated activity patterns during in vitro development.** *Brain research* 2006, **1093(1)**:41-53.
- Tateno T, Kawana A, Jimbo Y: **Analytical characterization of spontaneous firing in networks of developing rat cultured cortical neurons.** *Physical review* 2002, **65(5 Pt 1)**:051924.
- Van Pelt J, Corner MA, Wolters PS, Rutten WL, Ramakers GJ: **Long-term stability and developmental changes in spontaneous network burst firing patterns in dissociated rat cerebral cortex cell cultures on multielectrode arrays.** *Neuroscience letters* 2004, **361(13)**:86-89.
- Kamioka H, Maeda E, Jimbo Y, Robinson HP, Kawana A: **Spontaneous periodic synchronized bursting during formation of mature patterns of connections in cortical cultures.** *Neuroscience letters* 1996, **206(23)**:109-112.
- Illes S, Fleischer W, Siebler M, Hartung HP, Dihné M: **Development and pharmacological modulation of embryonic stem cell-derived neuronal network activity.** *Experimental neurology* 2007, **207(1)**:171-176.
- Ban J, Bonifazi P, Pinato G, Broccard FD, Studer L, Torre V, Ruaro ME: **Embryonic stem cell-derived neurons form functional networks in vitro.** *Stem cells* 2007, **25(3)**:738-749.
- Conti L, Pollard SM, Gorba T, Reitano E, Toselli M, Biella G, Sun Y, Sanzone S, Ying QL, Cattaneo E, et al.: **Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell.** *PLoS biology* 2005, **3(9)**:e283.
- Hadjantonakis AK, Gertsenstein M, Ikawa M, Okabe M, Nagy A: **Generating green fluorescent mice by germline transmission of green fluorescent ES cells.** *Mechanisms of development* 1998, **76(12)**:79-90.
- Dihné M, Bernreuther C, Hagel C, Wesche KO, Schachner M: **Embryonic stem cell-derived neuronally committed precursor cells with reduced teratoma formation after transplantation into the lesioned adult mouse brain.** *Stem cells* 2006, **24(6)**:1458-1466.
- Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, Segal M, McKay RD: **Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro.** *Mechanisms of development* 1996, **59(1)**:89-102.
- Bibel M, Richter J, Schrenk K, Tucker KL, Staiger V, Korte M, Goetz M, Barde YA: **Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage.** *Nature neuroscience* 2004, **7(9)**:1003-1009.
- Johe KK, Hazel TG, Muller T, Dugich-Djordjevic MM, McKay RD: **Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system.** *Genes & development* 1996, **10(24)**:3129-3140.
- Ying QL, Stavridis M, Griffiths D, Li M, Smith A: **Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture.** *Nature biotechnology* 2003, **21(2)**:183-186.
- Watanabe K, Kamiya D, Nishiyama A, Katayama T, Nozaki S, Kawasaki H, Watanabe Y, Mizuseki K, Sasai Y: **Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells.** *Nature neuroscience* 2005, **8(3)**:288-296.
- Nat R, Nilbratt M, Narkilahti S, Winblad B, Hovatta O, Nordberg A: **Neurogenic neuroepithelial and radial glial cells generated from six human embryonic stem cell lines in serum-free suspension and adherent cultures.** *Glia* 2007, **55(4)**:385-399.
- Palmer TD, Markakis EA, Willhoite AR, Safar F, Gage FH: **Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS.** *Journal of Neuroscience* 1999, **19(19)**:8487-8497.
- Woolson RF, Clarke WR: *Statistical Methods for the Analysis of Biomedical Data* 2nd edition. New York: Wiley-Interscience; 2002.
- Wagenaar DA, Pine J, Potter SM: **An extremely rich repertoire of bursting patterns during the development of cortical cultures.** *BMC neuroscience* 2006, **7**:11.
- Giugliano M, Darbon P, Arsiero M, Luscher HR, Streit J: **Single-neuron discharge properties and network activity in dissociated cultures of neocortex.** *Journal of neurophysiology* 2004, **92(2)**:977-996.
- Davies JE, Proschel C, Zhang N, Noble M, Mayer-Proschel M, Davies SJ: **Transplanted astrocytes derived from BMP- or CNTF-treated glial-restricted precursors have opposite effects on recovery and allodynia after spinal cord injury.** *Journal of biology* 2008, **7(7)**:24.
- Johnson MA, Weick JP, Pearce RA, Zhang SC: **Functional neural development from human embryonic stem cells: accelerated synaptic activity via astrocyte coculture.** *Journal of Neuroscience* 2007, **27(12)**:3069-3077.
- Okada Y, Matsumoto A, Shimazaki T, Enoki R, Koizumi A, Ishii S, Itoyama Y, Sobue G, Okano H: **Spatiotemporal recapitulation of central nervous system development by murine embryonic stem cell-derived neural stem/progenitor cells.** *Stem cells* 2008, **26(12)**:3086-3098.
- Goetz AK, Scheffler B, Chen HX, Wang S, Suslov O, Xiang H, Brustle O, Roper SN, Steindler DA: **Temporally restricted substrate interactions direct fate and specification of neural precursors derived from embryonic stem cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, **103(29)**:11063-11068.
- Lang RJ, Haynes JM, Kelly J, Johnson J, Greenhalgh J, O'Brien C, Mulholland EM, Baker L, Munsie M, Pouton CW: **Electrical and neurotransmitter activity of mature neurons derived from mouse embryonic stem cells by Sox-1 lineage selection and directed differentiation.** *The European journal of neuroscience* 2004, **20(12)**:3209-3221.
- Real MA, Davila JC, Guirado S: **Immunohistochemical localization of the vesicular glutamate transporter VGLUT2 in the developing and adult mouse claustrum.** *Journal of chemical neuroanatomy* 2006, **31(3)**:169-177.
- Kaneko T, Mizuno N: **Glutamate-synthesizing enzymes in GABAergic neurons of the neocortex: a double immunofluorescence study in the rat.** *Neuroscience* 1994, **61(4)**:839-849.
- Shibata T, Yamada K, Watanabe M, Ikenaka K, Wada K, Tanaka K, Inoue Y: **Glutamate transporter GLAST is expressed in the radial glia-astrocyte lineage of developing mouse spinal cord.** *Journal of Neuroscience* 1997, **17(23)**:9212-9219.
- Kornyeyi Z, Szlavik V, Szabo B, Gocza E, Czirok A, Madarasz E: **Humoral and contact interactions in astroglia/stem cell cocultures in the course of glia-induced neurogenesis.** *Glia* 2005, **49(3)**:430-444.
- Jiao J, Chen DF: **Induction of neurogenesis in nonconventional neurogenic regions of the adult central nervous system by niche astrocyte-produced signals.** *Stem cells* 2008, **26(5)**:1221-1230.
- Elkabetz Y, Panagiotakos G, Al Shamy G, Socci ND, Tabar V, Studer L: **Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage.** *Genes & development* 2008, **22(2)**:152-165.

37. Lowell S, Benchoua A, Heavey B, Smith AG: **Notch promotes neural lineage entry by pluripotent embryonic stem cells.** *PLoS biology* 2006, **4(5)**:e121.
38. Wilson PG, Stice SS: **Development and differentiation of neural rosettes derived from human embryonic stem cells.** *Stem cell reviews* 2006, **2(1)**:67-77.
39. Tomooka Y, Kitani H, Jing N, Matsushima M, Sakakura T: **Reconstruction of neural tube-like structures in vitro from primary neural precursor cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993, **90(20)**:9683-9687.
40. Götz M, Huttner WB: **The cell biology of neurogenesis.** *Nature reviews* 2005, **6(10)**:777-788.
41. Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI: **Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro.** *Developmental biology* 1995, **168(2)**:342-357.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

*"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."*

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:  
[http://www.biomedcentral.com/info/publishing\\_adv.asp](http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp)



# Cerebrospinal Fluid of Brain Trauma Patients Inhibits *in vitro* Neuronal Network Function via NMDA Receptors

Frauke Otto, MD,<sup>1</sup> Sebastian Illes, MSc,<sup>1</sup> Jessica Opatz, PhD,<sup>1</sup> Maurice Laryea, PhD,<sup>2</sup> Stephan Theiss, MSc,<sup>1</sup> Hans-Peter Hartung, MD,<sup>1</sup> Alfons Schnitzler, MD,<sup>1,3</sup> Mario Siebler, MD,<sup>1</sup> and Marcel Dihné, MD<sup>1</sup>

Neurological diseases frequently induce pathological changes of cerebrospinal fluid (CSF) that might secondarily influence brain activity, as the CSF–brain barrier is partially permeable. However, functional effects of CSF on neuronal network activity have not been specified to date. Here, we report that CSF specimens from patients with reduced Glasgow Coma Scale values caused by severe traumatic brain injury suppress synchronous activity of *in vitro*-generated neuronal networks in comparison with controls. We present evidence that underlying mechanisms include increased *N*-methyl-*D*-aspartate receptor activity mediated by a CSF fraction containing elevated amino acid concentrations. These proof-of-principle data suggest that determining effects of CSF specimens on neuronal network activity might be of diagnostic value.

Ann Neurol 2009;66:546–555

To support and maintain neuronal functionality *in vivo*, the biochemical composition of the extracellular fluid (ECF) that surrounds neurons is tightly regulated under physiological conditions. As the cerebrospinal fluid (CSF)–brain barrier is permeable particularly under pathological conditions, direct continuity between the ECF and the CSF exists, and the CSF both mirrors and influences, at least in part, the neuronal extracellular environment.<sup>1–3</sup> The possibility of directly measuring functional features of the CSF by *in vitro*-generated neuronal networks that are susceptible to discrete changes of the extracellular environment would

offer a novel approach for understanding pathological processes and for counteracting them.

Functional neuronal networks *in vitro* were generated by cultivation of rat primary cortical (rPC) cells<sup>4</sup> or murine embryonic stem (ES) cell-derived neural precursor cells on microelectrode arrays (MEAs).<sup>5,6</sup> This technology represents a bioelectronic fusion of synaptically interconnected neurons and an arrangement of multiple extracellular electrodes (Fig 1) that can detect and characterize the electrophysiological activity of entire spatially distributed neuronal populations over several weeks or months. In addition to rPC cells, murine ES cell-derived neural precursors also give rise to terminally differentiated, mature, and functional neurons<sup>7–9</sup> of sufficient purity.<sup>10</sup> Both populations develop synchronously oscillating bursting as the most prominent feature of electrical activity in neuronal networks<sup>11</sup> generated from dissociated cells. Moreover, the functional network activity reacts dose dependently to different synaptically acting substances such as glutamate or gamma-amino butyric acid. Thus, both rPC and ES cell-derived networks might be helpful to investigate and detect neuroactive substances.

Functional network activity of rPC or ES cell-derived neural populations was first recorded in well-defined artificial CSF (aCSF) that provoked robust oscillating network activity. To verify the functional impact of physiological CSF on network activity, we exposed functional neuronal networks to pure human CSF (Table 1). Human CSF (hCSF) was obtained for diagnostic purposes from individuals suffering from normal pressure hydrocephalus or pseudotumor cerebri. In these control patients, who exhibited only comparably slight clinical symptoms, intracranial pathology like brain tumors, cerebral hemorrhage, or cerebral ischemia were excluded via magnetic resonance imaging (MRI) or computed tomography. To exclude metabolic or inflammatory cerebral diseases, only CSF specimens with routine parameters (cell counts, protein, lactate, glucose) within normal ranges were used. For the first time, we could demonstrate that, in addition to aCSF, the application of hCSF was also well tolerated by synchronously oscillating rPC or ES cell-derived networks. Global activity parameters like spike and burst rate were enhanced in both rPC and ES cell-derived populations after application of hCSF compared with aCSF (Fig 2). Interestingly, parameters representative for synchronous network activity such as kappa, which positively correlates to the temporal coupling of single electrodes within the network, were significantly increased only in ES cell-derived networks after hCSF application (Fig 2B–D). Aberrant concentrations of electrophysiologically important ions like sodium, potassium, calcium, or magnesium might contribute to the observed functional differences between hCSF and aCSF (Table 1). However, if compared with

From the <sup>1</sup>Department of Neurology, <sup>2</sup>Department of General Pediatrics, and <sup>3</sup>Institute of Clinical Neuroscience and Medical Psychology, Heinrich-Heine University, Düsseldorf, Germany.

Address correspondence to Dr Dihné, Department of Neurology, Heinrich-Heine University, Moorenstr. 5, 40225 Düsseldorf, Germany. E-mail: Marcel.Dihne@uni-duesseldorf.de

Potential conflict of interest: Nothing to report.

Received Sep 17, 2008, and in revised form Jul 1, 2009. Accepted for publication Jul 10, 2009. Published in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/ana.21808



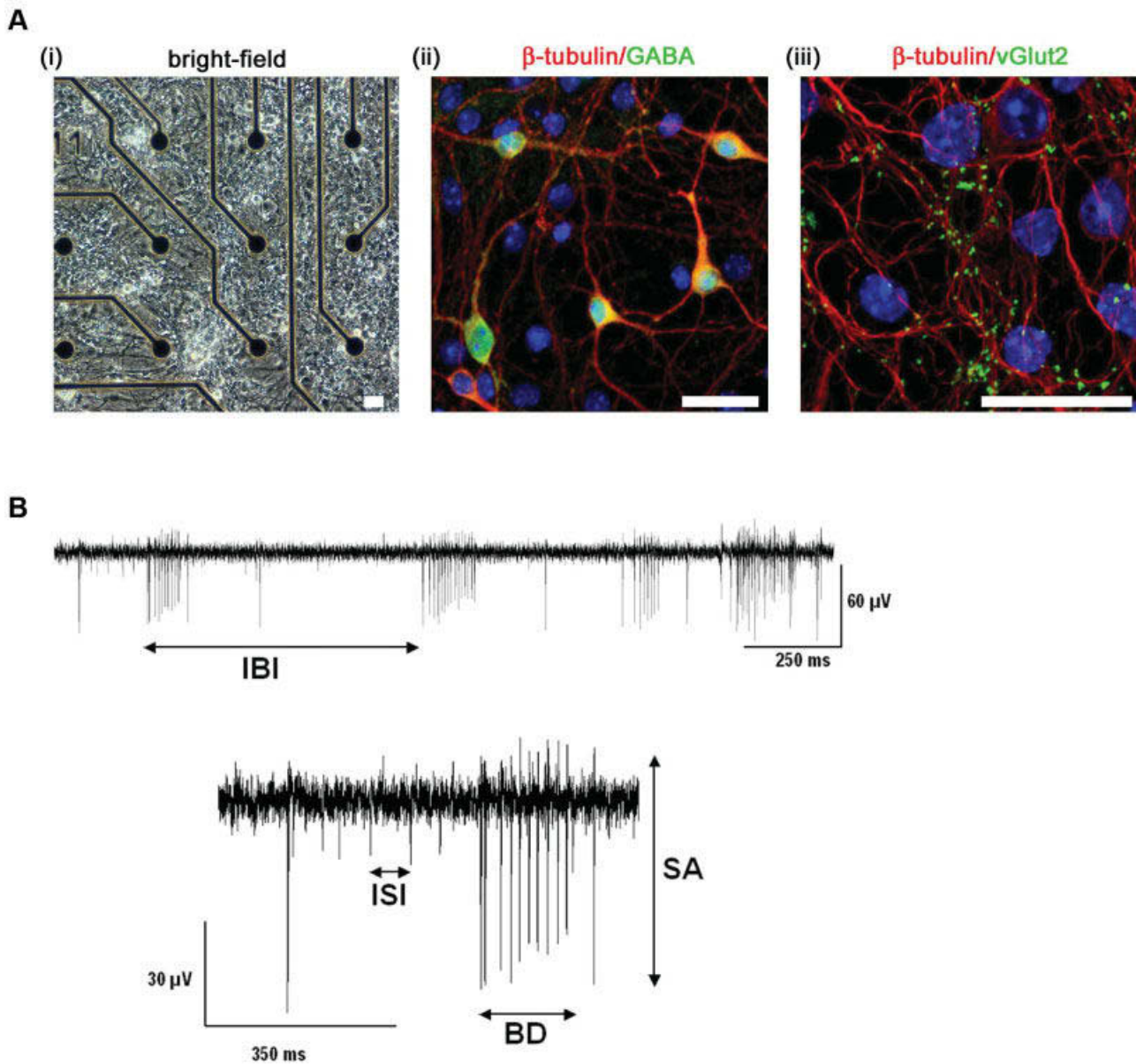


Fig 1. (A) Phase-contrast image (i) and immunocytochemical staining for  $\beta$ -tubulin (red) and gamma-aminobutyric acid (GABA; green) (ii) or  $\beta$ -tubulin (red) and vesicular glutamate transporter-2 (vGlut2; green) (iii) 21 days after terminal differentiation of embryonic stem cell-derived progeny on microelectrode arrays (MEAs). Note the dense network of  $\beta$ -tubulin<sup>+</sup> neurites that originate from either GABAergic (ii, merged yellow signal) or glutamatergic neurons whose presynaptic terminals are visualized (iii, green). Scale bar = 30  $\mu$ m. (B) Electrical recording trace of a single MEA electrode to visualize different electrophysiological parameters such as the interburst interval (IBI, upper panel), interspike interval (ISI), burst duration (BD), and spike amplitude (SA, lower panel). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com)]

aCSF, the specific composition of hCSF with regard to a variety of additional components such as lactate and different amino acids might also support network activity (Table 1).

We then investigated if the electrophysiological patterns of rPC or ES cell-derived network activity are susceptible to pathologically altered CSF compositions. For this, CSF was obtained from external ventricular drainage of patients suffering from focal traumatic

brain injury (TBI), in the following referred to as traumatic CSF (tCSF). The analyzed tCSF specimens ( $n = 12$ ) were obtained from patients who displayed severe injury-related reduced alertness expressed through pathological values in the Glasgow Coma Scale (GCS). An overview of patient data is given in Table 2. Traumatic CSF specimens showed slightly increased levels of protein and lactate as well as pleocytosis (Table 1), and therefore all CSF specimens used in this study

**Table 1. CSF Composition**

ID	Sodium CSF, mmol/l	Potassium CSF, mmol/l	Calcium CSF, mmol/l	Magnesium CSF, mmol/l	Protein CSF, mg/dl	Glucose CSF, mg/dl	Lactate CSF, mmol/l
Reference	145 ± 3.9	2.96 ± 0.17	1.19 ± 0.08	0.89 ± 0.17	20–50	40–76	1.1–2.4
aCSF	150 <sup>a</sup>	3.0	1.0 <sup>a</sup>	1.0	—	180.16	—
hCSF-1	159 <sup>a</sup>	3.9 <sup>a</sup>	1.12	1.06	58 <sup>a</sup>	87 <sup>a</sup>	1.5
hCSF-2	147	2.9	0.72 <sup>a</sup>	1.14 <sup>a</sup>	46	67	1.4
hCSF-3	152 <sup>a</sup>	3.6 <sup>a</sup>	1.16	1.06	29	65	2.4
hCSF-4	142	2.9	0.69 <sup>a</sup>	1.1 <sup>a</sup>	37	67	1.6
hCSF-5	148	2.7	1.15	1.16 <sup>a</sup>	32	67	1.6
tCSF-1	146	2.4 <sup>a</sup>	0.78 <sup>a</sup>	0.79	78 <sup>a</sup>	56	3.6 <sup>a</sup>
tCSF-2	157 <sup>a</sup>	2.3 <sup>a</sup>	1.02 <sup>a</sup>	1.07 <sup>a</sup>	55 <sup>a</sup>	69	3.8 <sup>a</sup>
tCSF-3	113 <sup>a</sup>	1.8 <sup>a</sup>	0.75 <sup>a</sup>	0.81	48	59	1.3
tCSF-4	148	2.4 <sup>a</sup>	0.89 <sup>a</sup>	0.95	221 <sup>a</sup>	60	5.1 <sup>a</sup>
tCSF-5	151 <sup>a</sup>	2.7	1.02 <sup>a</sup>	1.03	54 <sup>a</sup>	73	2.0

<sup>a</sup>Elevation out of physiological ranges. CSF = cerebrospinal fluid; aCSF = artificial CSF; hCSF = human CSF; tCSF = traumatic CSF.

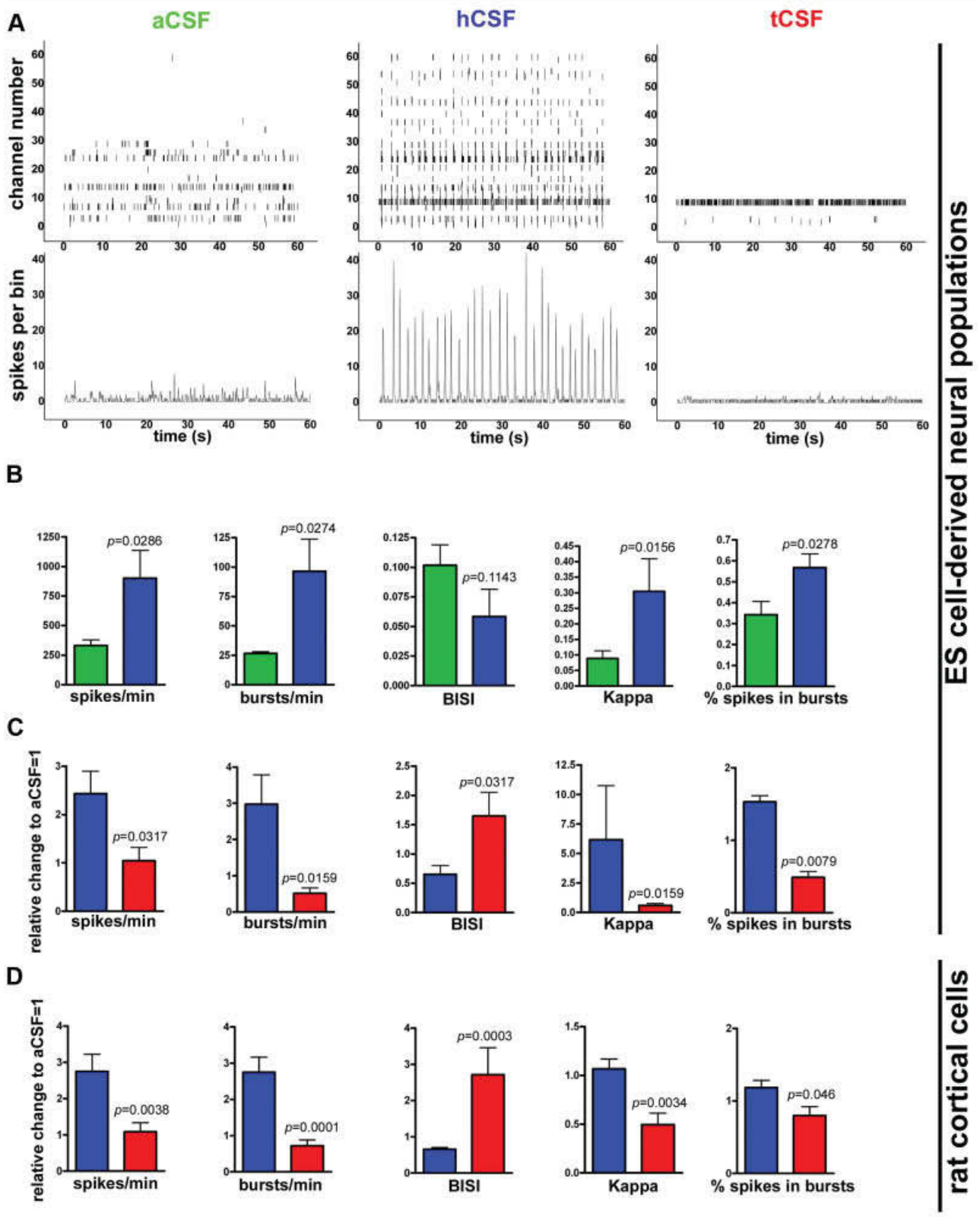
were centrifuged before application on MEAs. Traumatic CSF specimens significantly modulated neuronal network activity of both rPC and ES cell-derived neuronal populations in comparison with hCSF by means of inhibition and desynchronization, as illustrated by reduced spike rates and kappa values (Fig 2C, D). Thereby, similar changes in network activity of 2 different neuronal populations following tCSF application considerably consolidate the observed effects. Thus, rPC or ES cell-derived neuronal networks on MEAs for the first time allowed direct visualization and measurement of the functional impact of pathologically altered CSF specimens on neuronal network activity without the use of sharp or patch-clamp electrodes.

Control experiments using modified aCSF argue against a major role of ionic deviations within those ranges that were observed in hCSF or tCSF specimens, as no significant suppression or enhancement of global activity or network synchrony could be observed (data not shown). Further experiments using control CSF with high protein concentrations obtained from ventricular drainage revealed that neither the mode of CSF acquisition nor protein contents exerted similar effects on neuronal network activity (data not shown). The original pH values of hCSF (mean value, 7.35) and tCSF specimens (mean value, 7.31) did not significantly differ. Nevertheless, to unambiguously exclude that varying pH values diversely impact network activity, we adjusted the pH of all hCSF and tCSF specimens to 7.4. This pH value, which is slightly more alkaline compared with physiological human CSF, was chosen to provide stringent comparability between hu-

man CSF samples and previously obtained data in aCSF that was conventionally adjusted to pH 7.4.<sup>4</sup>

The pathophysiology of TBI involves 2 crucial steps.<sup>12</sup> The first step includes a direct damage of the

*Fig 2. (A) Representative spike raster plots (upper panel) and frequency counts (lower panel) of embryonic stem (ES) cell-derived networks in artificial cerebrospinal fluid (aCSF), human CSF (hCSF), or traumatic CSF (tCSF). Spike raster plots illustrate the spike activity on all 60 microelectrode array electrodes (y axis) during a time interval of 60 seconds (x axis). Frequency counts visualize the synchrony of neuronal networks, as amplitudes represent the total number of spikes within a short time interval of 100 milliseconds (bin). Note the increased synchronous activity in hCSF and the decreased activity in tCSF. (B) Different electrophysiological parameters of ES cell-derived networks are shown as absolute values of network activity in aCSF (n = 5, green) and hCSF (n = 5, blue). BISI = intraburst interspike interval. Values are presented as mean + standard error of the mean (SEM), individual p values are given, and the 2-tailed Mann-Whitney U test is used. (C) Same parameters as in (B), illustrating values of electrophysiological parameters of hCSF (n = 5, blue) versus tCSF (n = 5, red) in relation to aCSF (y axis) on ES cell-derived networks. Values are presented as mean + SEM, individual p values are given, and the 2-tailed Mann-Whitney U test is used. (D) Same parameters as in (B) and (C), illustrating values of electrophysiological parameters of hCSF (n = 12, blue) versus tCSF (n = 12, red) in relation to aCSF (y axis) on primary rat cortical cells. Values are presented as mean + SEM, individual p values are given, and the 2-tailed Mann-Whitney U test is used. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com)]*



brain by the injury itself. A secondary step involves several distinct delayed metabolic processes that spread from the initial lesion site toward remote brain areas.

This secondary damage is thought to be responsible for the frequently observed discrepancies between direct TBI-related brain damage and a globally disturbed brain

**Table 2. Patient Data**

ID	Gender/ Age, y	Diagnosis	GCS o/a	Glutamate CSF, $\mu\text{M}$	Glycine CSF, $\mu\text{M}$	Serine CSF, $\mu\text{M}$	Glutamine CSF, $\mu\text{M}$	Methionine CSF, $\mu\text{M}$	Alanine CSF, $\mu\text{M}$
Reference			15	0.8–30.8	0.7–14	23–38	284–566	0–8.8	12–42
tCSF-1	M/56	SDH, SAB	4	54 <sup>a</sup>	29 <sup>a</sup>	33	273	5	67 <sup>a</sup>
tCSF-2	F/50	SAB, Stroke	10	16	4	4	69	1	7
tCSF-3	M/45	SDH, SAB	8	5	14 <sup>a</sup>	33	280	2	40
tCSF-4	M/53	SDH	3	29	34 <sup>a</sup>	44 <sup>a</sup>	375	4	76 <sup>a</sup>
tCSF-5	M/39	SAB, ICB	3	9	8	20	323	1	24
tCSF-6	M/17	ICB, SAB	3	10	15 <sup>a</sup>	44 <sup>a</sup>	465	5	52 <sup>a</sup>
tCSF-7	M/67	SAB, ICB	3	9	13	23	393	2	73 <sup>a</sup>
tCSF-8	F/49	ICB	3	26	25 <sup>a</sup>	22	476	2	79 <sup>a</sup>
tCSF-9	M/36	ICB	14	25	16 <sup>a</sup>	50 <sup>a</sup>	412	2	30
tCSF-10	M/66	ICB	8	19	36 <sup>a</sup>	56 <sup>a</sup>	537	2	83 <sup>a</sup>
tCSF-11	F/58	ICB, SAB	3	105 <sup>a</sup>	44 <sup>a</sup>	78 <sup>a</sup>	362	11 <sup>a</sup>	119 <sup>a</sup>
tCSF-12	M/54	CC	3	24	36 <sup>a</sup>	44 <sup>a</sup>	568	6	68 <sup>a</sup>

The first 5 cerebrospinal fluid (CSF) specimens were used for microelectrode array analysis (MEA) on embryonic stem cell-derived networks, and all specimens were used for MEA analysis on primary cortical cell-derived networks. <sup>a</sup>Elevation out of normal range. GCS o/a = Glasgow Coma Scale on admission; tCSF = traumatic CSF; M = male; SDH = subdural hematoma; SAB = subarachnoid bleeding; F = female; ICB = intracranial bleeding; CC = cerebral contusion.

function that exceeds the TBI-related focal functional impairment. Secondary brain damage after TBI includes the release of excessively high concentrations of excitatory amino acids (EAAs) such as glutamate, leading to an intracellular calcium and sodium overload and apoptotic cell death. Metabolic disturbances that spread from the initial lesion site have been measured in direct vicinity of the primary lesion site by microdialysis<sup>13</sup> and recently also within the CSF of TBI patients,<sup>3,14</sup> and thus might carry pathological events over longer distances within the central nervous system. Interestingly, it could be shown that predominantly EAAs are increased after TBI, and they tend to correlate with the clinical outcome.<sup>14</sup> However, the direct functional consequences of pathologically elevated metabolic substances within the CSF of TBI patients has remained unclear until now.

To clarify if substances acting on glutamate receptors are involved in tCSF-related suppression of network activity, we additionally applied the glutamate antagonist 2*R*-amino-5-phosphonovaleric acid (APV), which specifically blocks the active site of *N*-methyl-*D*-aspartate (NMDA) receptors. APV significantly recovered electrophysiological parameters like bursts per minute and also increased significantly the synchrony in tCSF-related suppressed neuronal networks, as demonstrated by elevated kappa values (Fig 3A). However, inhibition of NMDA receptors did not completely normalize tCSF-related network suppression, as some parameters (eg, spikes per minute) were not significantly recovered (Fig 3A). In contrast, application of APV to

nonsuppressed functional neuronal networks under the influence of hCSF caused no significant change in kappa values, but significantly decreased burst and spike rates (Fig 3A), indicating that APV exerts opposite effects on electrophysiological parameters depending on the state of network activity. Thus, enhanced NMDA receptor activity obviously plays a major role in tCSF-related suppression, as antagonizing pathologically enhanced NMDA receptor activity increased network activity. Following a stepwise elevation of NMDA concentrations in aCSF to calibrate the system for NMDA receptor-mediated neuronal network effects, a trend toward a biphasic effect on network activity was observed. After an initial nonsignificant enhancement at low NMDA concentrations of 5  $\mu\text{M}$ , synchronous network activity significantly decreased at NMDA concentrations of 30  $\mu\text{M}$ , showing that NMDA receptor-mediated network activity can be functionally blocked via overstimulation (Fig 3B). Most importantly, APV led to a significant recovery of values for kappa and bursts per minute following NMDA-mediated network suppression in aCSF (Fig 3B). In nonsuppressed neuronal networks (aCSF without NMDA), APV had no significant influence on kappa values, but led to a suppression of burst rates (Fig 3C). Thus, aCSF with NMDA mimics tCSF, underlining the network-suppressing role of pathologically elevated concentrations of substances within tCSF that act at the NMDA receptor. Interestingly, specific inhibition of the AMPA/kainate receptor was not able

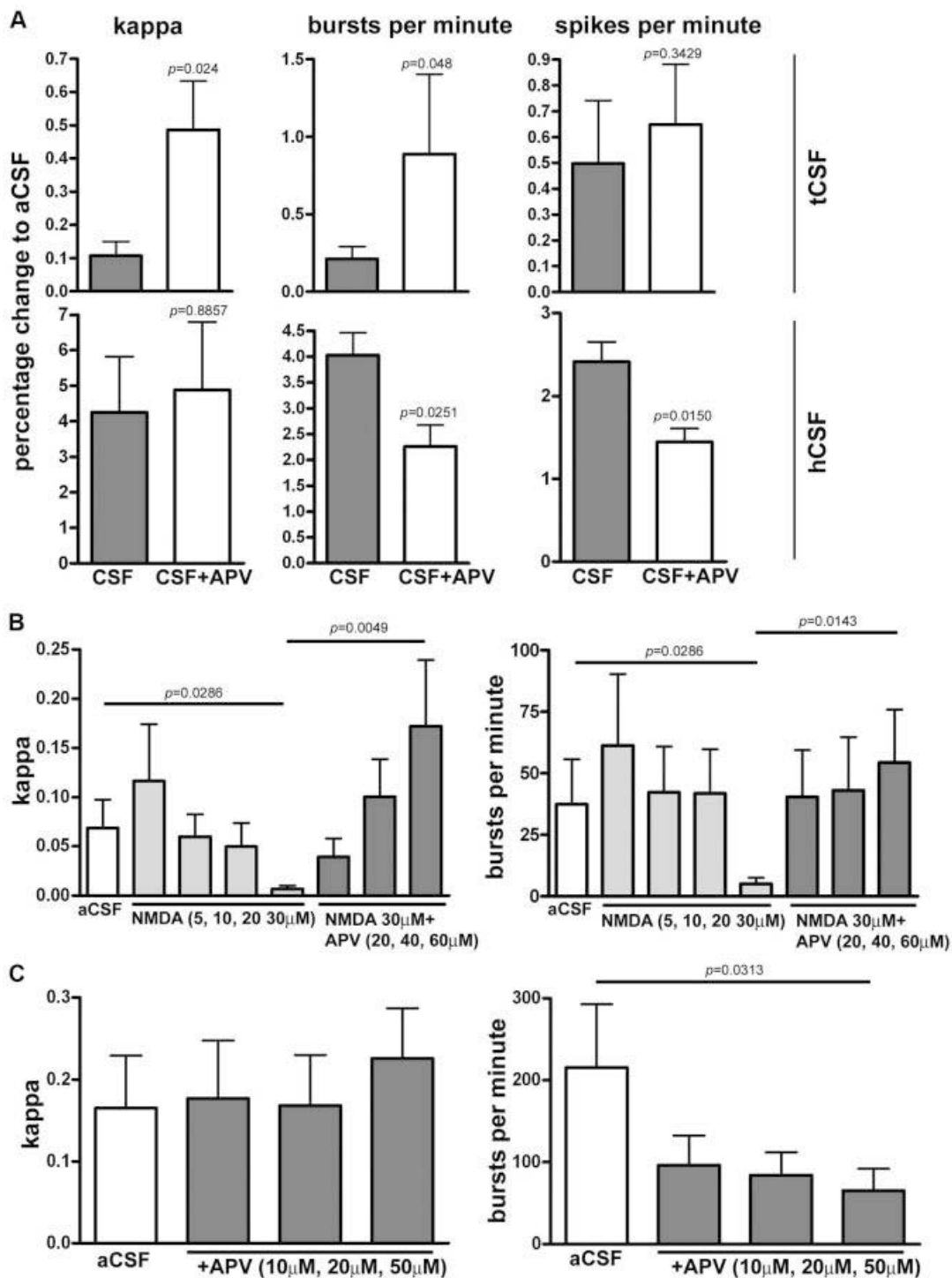


Fig 3. (A) Diagrams show changes in kappa, bursts per minute, or spikes per minute in embryonic stem cell-derived networks after application of 20 μm 2R-amino-5-phosphonovaleric acid (APV) to human cerebrospinal fluid (hCSF) or traumatic CSF (tCSF). Values are presented as mean + standard error of the mean (SEM), individual p values are given, the 2-tailed Mann-Whitney U test is used, and n = 4. (B) Diagrams show absolute values of kappa and bursts per minute in aCSF and different concentrations of N-methyl-D-aspartate (NMDA) and APV as indicated. Values are presented as mean + SEM, individual p values are given, the 2-tailed Mann-Whitney-U-test is used, and n = 4. (C) Diagrams show absolute values of kappa and bursts per minute in aCSF and different concentrations of APV as indicated. Values are presented as mean + SEM, individual p values are given, the 2-tailed Mann-Whitney U test is used, and n = 4. aCSF = artificial CSF.

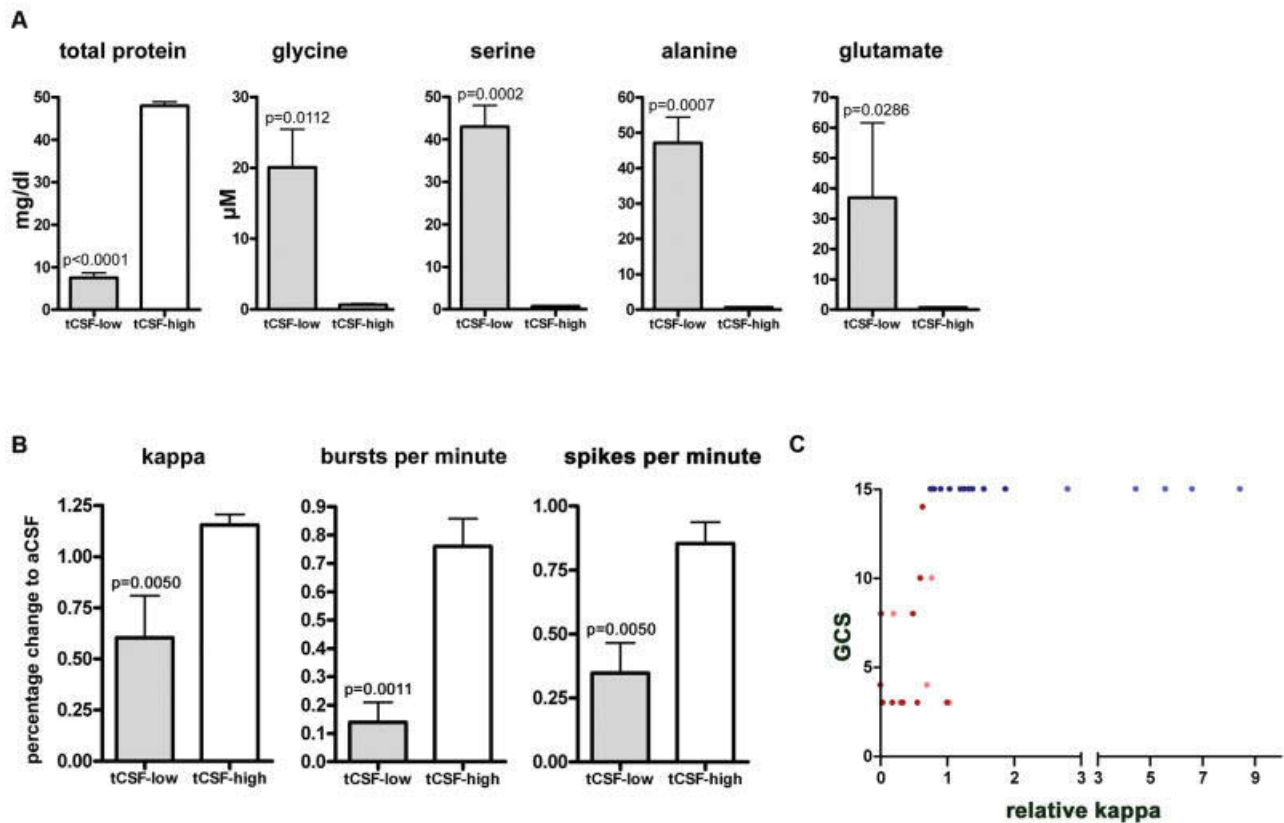


Fig 4. (A) Diagrams show absolute values for total protein content and different amino acids in traumatic cerebrospinal fluid (tCSF)-low or tCSF-high to illustrate efficacy of the dialysis procedure. Values are presented as mean + standard error of the mean (SEM), individual p values are given for tCSF-low versus tCSF-high, the 2-tailed Mann-Whitney U test is used, and  $n = 4$ . (B) Diagrams show changes in values for kappa, bursts per minute, or spikes per minute in embryonic stem cell (ES)-derived networks after application of tCSF-low or tCSF-high. Values are presented as mean + SEM, individual p values are given for tCSF-low versus tCSF-high, the 2-tailed Mann-Whitney U test is used, and  $n = 4$ . (C) Relative kappa values (synchrony of network activity) of 5 human CSF (hCSF; blue) and 5 tCSF (pink) specimens on ES cell-derived networks and 12 hCSF (deep blue) and 12 tCSF (brown) specimens on primary cortical networks are plotted against values in Glasgow Coma Scale (GCS) of individual patients. Spearman's nonparametric correlation test calculated a 2-tailed p value of  $<0.0001$  and a coefficient of correlation of 0.7528. The kappa value of artificial CSF (aCSF) on rat primary cortical or ES cell-derived networks was set to 1 to provide comparability between 2 different neuronal populations. A decrease in synchrony (kappa ratio  $< 1$ ) was detected in 16 of 17 cases after application of tCSF; hCSF led to increased kappa ratios  $> 1$  in 13 out of 17 cases compared with aCSF. Tentatively setting a kappa threshold value of 0.75 to obtain 100% specificity within our limited sample, we found 14 out of 17 tCSF specimens with kappa values  $< 0.75$  (sensitivity =  $14/17 = 0.82$ ); by definition all 17 hCSF specimens exhibited kappa values  $> 0.75$ . [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com)]

to recover tCSF-related network suppression, but increased network inhibition (data not shown), indicating that tCSF-related network suppression might predominantly operate at the NMDA receptor.

However, our biochemical investigations revealed that glutamate concentrations were elevated in only 2 out of 12 tCSF specimens (Table 2). This suggests an additional influence of 1 or more substances besides glutamate that are known to act at the NMDA receptor. As most tCSF specimens also contained elevated concentrations of glycine, serine, or alanine (Table 2), which are known to support NMDA receptor activity,<sup>15</sup> it may be speculated that these substances also

disturb functional neuronal networks exposed to tCSF. To directly verify the network suppressive role of amino acids, we generated 2 separate tCSF fractions containing either molecules  $< 3.5$  kD (tCSF-low) or  $> 1$  kD (tCSF-high). tCSF-low predominantly contained amino acids such as glycine, serine, alanine, or glutamate, whereas total protein content was low, and vice versa (Fig 4A). Concentrations of glucose, lactate, and different ions were reconstituted in different groups to normal levels of aCSF. Whereas neuronal network function did not significantly deviate under the influence of tCSF-high in comparison to aCSF, tCSF-low significantly suppressed different network

parameters (Fig 4B). These data unambiguously identified the tCSF-low fraction containing elevated concentrations of amino acids as responsible for the network suppressive effects of tCSF. Furthermore, we exemplarily applied glycine to functional neuronal networks and found that concentrations of 50 $\mu$ M significantly decreased kappa values by approximately 78% ( $p = 0.0257$ ) and spike rates by approximately 66% ( $p = 0.0102$ ). This effect was reversed by kynurenic acid, a specific antagonist at the glycine binding site on NMDA receptors indicating that amino acids other than glutamate are also responsible for network suppression via NMDA receptor modulation (Fig 3B).

Findings in cranial MRIs did not always conclusively explain dramatically reduced values in GCS in our TBI patients, although frequently corresponding tCSF specimens strongly suppressed neuronal network activity in vitro, thus suggesting that bioelectronic hybrid systems might detect CSF alterations that are functionally relevant in vivo. This functional relevance is further substantiated in that Spearman's rho indicates a correlation between the degree of network synchrony (kappa values) and associated GCS values, although there was no linear relationship (Fig 4C). A randomized study with a larger sample size will be required to test whether changes in kappa values can be used to classify the level of consciousness in patients and control subjects. Thus, functional neuronal networks might represent, at least in part, a simplified model for global brain function that is able to detect CSF alterations that accompany a reduced consciousness of individual TBI patients.

This novel model might allow correlating CSF molecules formerly unidentified or unappreciated in terms of potential neurotoxicity to different metabolic encephalopathies or even to distinct mental conditions. By biochemically antagonizing the effects of pathological CSF specimens on neuronal network activity in vitro and systematically fractionating CSF contents, this platform might lead toward a broadened understanding of functional brain activity and new therapeutic strategies that can be applied directly and, most importantly, individually. The employment of murine ES cell-derived neuronal networks in addition to conventional primary cortical networks directly paves the way toward the generation of bioelectronic hybrid systems on the basis of predifferentiated human ES cells<sup>16,17</sup> or individually induced pluripotent stem cells.<sup>18,19</sup> Human neuronal networks would provide homologous, standardized, and defined systems whose validity and predictability regarding the in vivo human situation would further increase.

## Material and Methods

### *Collection of CSF*

CSF from patients with traumatic brain injury was obtained within the 1st week after the injury from external ventricular drainage inserted for treatment of intracranial hematoma and increased intracranial pressure. These CSF specimens were taken directly from the drainage tubes that showed a constant CSF flow and not from the reservoir. Lumbar CSF was obtained from patients admitted to our department for diagnostic purposes. All CSF specimens were immediately centrifuged, divided into aliquots, and stored at  $-35^{\circ}\text{C}$ . Ethics approval for the use of human CSF was obtained from the institutional ethics committee. A total of 12 specimens from inpatients with normal CSF analyses and 12 specimens from TBI inpatients were used for this study. Details on patient data are given in Tables 1 and 2. Prior to analyses, CSF was thawed, and the pH was adjusted to 7.4. All CSF specimens were sterile.

### *Generation of Low and High Molecular Fractions of tCSF*

Traumatic CSF specimens were used for the generation of low molecular fractions ( $<3.5\text{kDa}$ ) and high molecular fractions ( $>1\text{kDa}$ ). For the generation of low molecular fractions, 600 $\mu$ L of tCSF was ultracentrifuged (100,000rpm, 1 hour,  $4^{\circ}\text{C}$ ). The supernatants were ultrafiltrated by centrifugal filter (Microcon YM-3, Millipore, Schwalbach, Germany) according to manufacturers' instructions (500 $\mu$ L, 12,000g, 1 hour, room temperature). The filtrates of each probe containing molecules  $<3.5\text{kDa}$  were separately collected and referred to as low molecular fraction of tCSF (tCSF-low). For the generation of high molecular fractions, 1ml tCSF was dialyzed using mini dialysis tubes (Mini dialysis Kit, 1kDa cutoff, 2ml, Amersham Bioscience, Freiburg, Germany) against 30ml aCSF, first at room temperature for 6 hours and then at  $4^{\circ}\text{C}$  overnight. Every 2 hours the aCSF solution was renewed. The retentates for each probe containing molecules  $>1\text{kDa}$  were collected separately and referred to as high molecular fractions of tCSF (tCSF-high).

### *Determination of CSF Constituents*

To analyze concentrations of single amino acids, CSF was deproteinized by adding 12mg sulfosalicylic acid to 200 $\mu$ L CSF. The mixture was vortexed and left at  $4^{\circ}\text{C}$  for 30 minutes. After centrifugation, the amino acids were analyzed on an automated amino acid analyzer (LC3001, Biotronik, Munich, Germany) using a cationic exchange resin with a gradient of lithium citrate elution buffers and postcolumn derivatization with ninhydrin, according to the instructions of the manufacturers. For determination of concentrations of proteins, lactate, glucose, and ions within CSF specimens, standard procedures (indicated in brackets) were applied according to the manufacturer's instructions (all kits and equipment were from Roche Diagnostics/Hitachi, Mannheim, Germany): protein (microturbidimetric method), lactate (photometric detection of lactatoxidase (LOD)/peroxidase (POD) reaction), glucose (hexokinase method), calcium (photometric detection of calcium o-cresolphthalein complex reaction), magnesium (photometric detection of xyldblau reaction), sodium, potassium, and chloride (determination of isoelectric point).

### Cell Culture

Differentiation of embryonic stem cells is described elsewhere<sup>20–22</sup> with minor modifications. Undifferentiated ES cells were expanded on 0.1% gelatin-coated (Sigma, Steinheim am Albuch, Germany) dishes in the presence of  $1 \times 10^5$  units leukemia inhibitory factor (Chemicon, Hofheim, Germany). After formation of embryoid bodies, neural differentiation was induced with a mixture of Dulbecco minimal essential medium/F12 and Neurobasal medium supplemented with N2, B27, and glutamine for 6 days, resulting in neural-induced, serum-free, floating cultures of embryoid-body-like aggregates (SFEBs) (all components from Gibco, Karlsruhe, Germany). Neural-induced SFEBs were propagated by adding fibroblast growth factor-2 (PeproTech, Rocky Hill, NJ) for a further 6 days and then seeded ( $1\text{--}4 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) and propagated on poly-L-ornithine and laminin-coated (both from Sigma) dishes or MEAs. Three weeks after seeding, ES cell-derived neurons developed synchronously oscillating networks, which were used to characterize CSF specimens.

To compare the functional aspects of ES cell-derived networks with those of conventionally used primary neural cell populations, we additionally performed experiments with embryonic Day 18 primary rat cortical cell-derived networks.<sup>4</sup> Cryopreserved cell suspensions with embryonic Day 18 rat cortical neurons and glial cells (CryoCell Rat Brain Cortex Cells, Sprague Dawley, QBM Cell Science, Ottawa, Canada) were plated at a density of 1 to  $4 \times 10^5$ /cm<sup>2</sup> onto poly-D-lysine- and laminin-coated MEAs in B27-supplemented Neurobasal medium (both from Invitrogen, Karlsruhe, Germany) and cultured under serum-free conditions in a humidified atmosphere (5% CO<sub>2</sub>/95% air) at 37°C. The medium was replaced twice a week. Synchronously oscillating networks after 3 weeks of culture were used to characterize CSF specimens. Although global activity levels of primary cortical networks were slightly elevated compared with ES cell-derived networks, possibly due to developmental or maturational differences, functional network parameters such as burst duration, interburst intervals, and synchrony levels were similar in both neuronal populations.

### Immunocytochemistry

For immunocytochemical investigations, cultured cells were washed in phosphate-buffered saline and fixed for 15 min in 4% paraformaldehyde. Primary antibodies were monoclonal mouse antibodies to  $\beta$ -tubulin III (1:750, Sigma) and vesicular glutamate transporter-2 (1:10,000, Chemicon), and polyclonal rabbit antibodies to  $\beta$ -tubulin III (1:750, R&D Systems, Minneapolis, MN) and to gamma-aminobutyric acid (1:1,000, Sigma). Appropriate secondary antibodies coupled to Cy2 or Cy3 (1:750, Dianova, Hamburg, Germany) were applied. Cell cultures were counterstained for 1 minute with 4',6-diaminodino-2-phenylindol (2 $\mu$ g/ml, Serva, Heidelberg, Germany) to visualize cell nuclei. Images were collected with a confocal-laser scanning microscope (LSM 510, Zeiss, Oberkochen, Germany).

### Electrophysiological Recording and Analysis

Extracellular potentials were recorded simultaneously on MEAs with a square grid of 60 planar Ti/TiN-

microelectrodes (30 $\mu$ m diameter, 200 $\mu$ m spacing) as described elsewhere.<sup>6</sup> All spike waveforms were stored separately and visually inspected for artifacts. The burst detection relied on an entropy-based algorithm. Interburst intervals were determined as time differences between the first spikes of subsequent bursts. Bursts were also checked by visual inspection for plausibility.

We examined the peak-to-peak amplitude of action potentials, spike rate, burst rate, duration of bursts, interburst interval, interspike interval, and interspike interval inside a burst as well as the number of spikes per burst. Recordings were started with a well-defined bath solution ("artificial CSF"; 150mM NaCl, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 4mM KCl, 10mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, 10mM glucose, pH 7.4; chemicals from Sigma, St. Louis, MO). Recordings were made at 37°C (head stage heating). Spontaneous spike rate was averaged over all electrodes and over the whole recording time (3 minutes for each measurement).

The ratio of spikes organized in bursts describes the pattern of activity. Temporal synchrony of spike activity across all electrodes was determined by binning all spikes into time intervals of 10 milliseconds. For each pair of active electrodes, the spikes in nonoverlapping bins were counted. A high percentage of bins without spikes on any electrode (empty bins) corresponds to weak activity or pronounced synchrony across channels. For all pairs of active electrodes, the agreement coefficient Cohen's kappa was calculated, which measures the degree of coincidence of spikes on both electrodes exceeding the chance-expected coincidence assuming uncorrelated spike activity. Theoretically, kappa may vary in the range  $-1$  to  $+1$ .

### Statistics

Data are presented as mean  $\pm$  standard error of means,  $n$  refers to the number of independent recordings. Statistical significance of differences between groups was determined using 2-tailed Mann-Whitney  $U$  test (GraphPadPrism, version 4.0);  $p$  values below .05 were considered significant. Individual  $p$  values were given for the different experiments. Mann-Whitney  $U$  test was chosen because a Gaussian distribution could not definitely be assumed. Spearman's nonparametric correlation test was used for correlation analysis.

---

This work was supported by the Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF, 01GN0503, M.D.), the "Christiane & Claudia Hempel-Stiftung für Klinische Stammzellforschung" (M.D.), the "Hannelore-Kohl-Stiftung ZNS" (M.S.) and the Forschungskommission der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (FOKO, F.O.).

---

The authors are grateful to Nadine Hamacher, Indre Thiel, Adrian Hülsewede and Christine Holland for excellent technical assistance and to Prof. Steiger (Department of Neurosurgery, Heinrich-Heine University Düsseldorf) for providing CSF samples. We thank QBM Cell Science (Ottawa, Canada) for kindly providing us rat cortical cell.



## References

- Abbott NJ. Evidence for bulk flow of brain interstitial fluid: significance for physiology and pathology. *Neurochem Int* 2004;45:545–552.
- Davson H. *The Physiology and Pathophysiology of the Cerebral Spinal Fluid*. New York, NY: Churchill Livingstone; 1987.
- Toczyłowska B, Chalimoniuk M, Wodowska M, Mayzner-Zawadzka E. Changes in concentration of cerebrospinal fluid components in patients with traumatic brain injury. *Brain Res* 2006;1104:183–189.
- Otto F, Gortz P, Fleischer W, Siebler M. Cryopreserved rat cortical cells develop functional neuronal networks on micro-electrode arrays. *J Neurosci Methods* 2003;128:173–181.
- Ban J, Bonifazi P, Pinato G, et al. Embryonic stem cell-derived neurons form functional networks in vitro. *Stem Cells* 2007;25:738–749.
- Illes S, Fleischer W, Siebler M, et al. Development and pharmacological modulation of embryonic stem cell-derived neuronal network activity. *Exp Neurol* 2007;207:171–176.
- Bain G, Kitchens D, Yao M, et al. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol* 1995;168:342–357.
- Barberi T, Klivenyi P, Calingasan NY, et al. Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. *Nat Biotechnol* 2003;21:1200–1207.
- Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, et al. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 2002;418:50–56.
- Dihne M, Bernreuther C, Hagel C, et al. Embryonic stem cell-derived neuronally committed precursor cells with reduced teratoma formation after transplantation into the lesioned adult mouse brain. *Stem Cells* 2006;24:1458–1466.
- Wagenaar DA, Madhavan R, Pine J, Potter SM. Controlling bursting in cortical cultures with closed-loop multi-electrode stimulation. *J Neurosci* 2005;25:680–688.
- Werner C, Engelhard K. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br J Anaesth* 2007;99:4–9.
- Nilsson OG, Polito A, Saveland H, et al. Are primary supratentorial intracerebral hemorrhages surrounded by a biochemical penumbra? A microdialysis study. *Neurosurgery* 2006;59:521–528.
- Chiang MF, Chiu WT, Lin FJ, et al. Multiparametric analysis of cerebral substrates and nitric oxide delivery in cerebrospinal fluid in patients with intracerebral haemorrhage: correlation with hemodynamics and outcome. *Acta Neurochir (Wien)* 2006;148:615–621; discussion 621.
- Danysz W, Parsons CG. Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: physiological significance and possible therapeutic applications. *Pharmacol Rev* 1998;50:597–664.
- Johnson MA, Weick JP, Pearce RA, Zhang SC. Functional neural development from human embryonic stem cells: accelerated synaptic activity via astrocyte coculture. *J Neurosci* 2007;27:3069–3077.
- Roy NS, Cleren C, Singh SK, et al. Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. *Nat Med* 2006;12:1259–1268.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;131:861–872.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007;318:1917–1920.
- Watanabe K, Kamiya D, Nishiyama A, et al. Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells. *Nat Neurosci* 2005;8:288–296.
- Nat R, Nilbratt M, Narkilahti S, et al. Neurogenic neuroepithelial and radial glial cells generated from six human embryonic stem cell lines in serum-free suspension and adherent cultures. *Glia* 2007;55:385–399.
- Ying QL, Stavridis M, Griffiths D, et al. Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat Biotechnol* 2003;21:183–186.

## Loss of Hypocretin (Orexin) Neurons With Traumatic Brain Injury

Christian R. Baumann, MD,<sup>1,2</sup> Claudio L. Bassetti, MD,<sup>1</sup> Philipp O. Valko, MD,<sup>1</sup> Johannes Haybaeck, MD,<sup>3</sup> Morten Keller, MD,<sup>4</sup> Erika Clark,<sup>2</sup> Reto Stocker, MD,<sup>5</sup> Markus Tolnay, MD,<sup>3</sup> and Thomas E. Scammell, MD<sup>2</sup>

Chronic, daytime sleepiness is a major, disabling symptom for many patients with traumatic brain injury (TBI), but thus far, its etiology is not well understood. Extensive loss of the hypothalamic neurons that produce the wake-promoting neuropeptide hypocretin (orexin) causes the severe sleepiness of narcolepsy, and partial loss of these cells may contribute to the sleepiness of Parkinson disease and other disorders. We have found that the number of hypocretin neurons is significantly reduced in patients with severe TBI. This observation highlights the often overlooked hypothalamic injury in TBI and provides new insights into the causes of chronic sleepiness in patients with TBI.

*Ann Neurol* 2009;66:555–559

Approximately 1.4 million people sustain traumatic brain injury (TBI) each year in the United States.<sup>1</sup> Coma and obtundation are common during the acute period, but even after 6 months recovery, 43% of patients have symptoms of sleep disorders.<sup>2,3</sup> In a pro-

From the <sup>1</sup>Department of Neurology, University Hospital, Zurich, Switzerland; <sup>2</sup>Department of Neurology, Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, MA; and <sup>3</sup>Department of Neuropathology, <sup>4</sup>Department of Forensic Medicine, and <sup>5</sup>Department of Surgical Intensive Care, University Hospital, Zurich, Switzerland.

Address correspondence to Dr Baumann, Department of Neurology, University Hospital Zurich, Frauenklinikstrasse 26, 8091 Zurich, Switzerland. E-mail: christian.baumann@usz.ch

Potential conflict of interest: Nothing to report.

Received Jan 25, 2009, and in revised form Jul 7. Accepted for publication Jul 31, 2009. Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/ana.21836