

DISS. ETH NO. 27495

ELECTRICAL STIMULATION AND FUNCTIONAL  
CHARACTERIZATION OF NEURONS USING HIGH-DENSITY  
MICROELECTRODE ARRAYS

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

Presented by  
SILVIA RONCHI  
Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica,  
Università degli studi di Roma La Sapienza

born on 09.06.1992

citizen of Italy

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Andreas Hierlemann

Prof. Dr. Ulrich Egert

Dr. Michele Fiscella

2021

## ABSTRACT

This thesis presents a comprehensive collection and analysis of multiple electrophysiology experiments using high-density microelectrode arrays (HD-MEAs). The motivation of this work was to explore the advantages, offered by high-resolution extracellular electrophysiology, and the use of HD-MEAs in the fields of (i) single-cell electrical stimulation, (ii) phenotype characterization of healthy and diseased cell lines and (iii) neural stem-cell maturation.

Compared to other state-of-the-art electrophysiology techniques, such as patch clamp, calcium imaging or the use of genetically-encoded voltage indicators, microelectrode arrays allow for long-term, non-invasive and non-phototoxic monitoring of single cells and entire neuronal networks. Additionally, the recent integration of microelectrode arrays in CMOS technology enables the simultaneous recording from thousands of closely-spaced electrodes so that action potentials of even subcellular compartments of neurons can be monitored. Moreover, new HD-MEA applications, such as single-cell electrical stimulation and detailed action-potential waveform and action-potential propagation analysis, became possible.

After an introduction (Chapter 1), this thesis presents new, optimized ways to perform single-neuron stimulation, relying on the 17.5  $\mu\text{m}$  electrode center-to-center distance. This small electrode-to-electrode distance enables to find the most effective stimulation locations of the targeted neurons and to select low-amplitude and efficient stimulation waveforms, while reducing the stimulation artifact. In Chapter 2, multiple stimulus waveforms, durations and amplitudes were analyzed for both, voltage- and current-stimulation modes. The axon initial segment was demonstrated to be the most effective stimulation site and its maturation in culture over time correlated with a decrease of the stimulation amplitude that was necessary to elicit an action potential.

Chapters 3 and 4 of the thesis include two studies that present new electrophysiological parameters or metrics that can be used to assess phenotypes and maturation states of different cell lines and to analyze compound effects. To date, electrophysiological differences and drug effects are still mostly studied by using standard metrics, such as the number of recorded bursts or action potentials, which do not take full advantage of the available high resolution of CMOS-based HD-MEAs.

In Chapter 3, commonly used and new network, single-cell and subcellular electrophysiology parameters and metrics are presented. These metrics were used to successfully characterize and compare different human induced pluripotent-stem-cell (iPSC)-derived dopaminergic and motor neuron lines and the corresponding isogenic disease lines for Parkinson's disease (PD) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Additionally, the metrics were used to analyze compound-dosage effects with high reproducibility.

In Chapter 4, neural stem cells were differentiated during 2, 4 and 7 months into mature neuronal networks and transferred simultaneously onto HD-MEAs. Additional metrics to the ones presented in Chapter 3, combined with single-cell RNA sequencing, allowed for successful distinction of the three maturation stages (2, 4 and 7 months) at network, single-cell and subcellular levels.

The thesis concludes with an outlook on potential applications of HD-MEAs in the field of high-content drug screening (Chapter 5).

## RIASSUNTO

In questa tesi viene presentata un'esaustiva raccolta di vari esperimenti elettrofisiologici che fanno uso di array di microelettrodi ad alta risoluzione (dall'inglese *high-density microelectrode arrays*, HD-MEAs). L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di voler esplorare i vantaggi offerti dall'elettrofisiologia extracellulare ad alta risoluzione e l'uso degli HD-MEAs nelle applicazioni di (i) stimolazione di singolo neurone, (ii) caratterizzazione del fenotipo di linee cellulari che presentano o meno una data manipolazione genetica correlata ad una patologia neurologica e (iii) studi sulla maturazione e lo sviluppo *in vitro* di colture cellulari neuronali.

Comparati con altre tecnologie di elettrofisiologia tipiche dello stato dell'arte, come il patch clamp, il calcium imaging e l'uso dei genetically-encoded voltage indicators, gli array di microelettrodi garantiscono il monitoraggio di singole cellule e interi network di neuroni per lungo tempo, in modo non invasivo e non fototossico. Inoltre, la recente integrazione degli array di microelettrodi nella tecnologia CMOS (complementary metal-oxide semiconductor) ha fatto sì che migliaia di elettrodi ravvicinati potessero registrare i potenziali d'azione neuronali anche da compartimenti subcellulari. Sono così divenute possibili nuove applicazioni nel campo degli HD-MEAs, come la stimolazione elettrica di singoli neuroni e lo studio dettagliato della forma d'onda e della propagazione del potenziale d'azione.

Dopo un'introduzione (Capitolo 1), vengono presentate modalità di stimolazione elettrica del singolo neurone nuove e ottimizzate, grazie ad una distanza di soli 17.5  $\mu\text{m}$  tra gli elettrodi. Questa breve distanza permette di trovare il sito ottimale di stimolazione nel neurone e di selezionare ampiezze basse e forme d'onda efficaci, riducendo l'artefatto da stimolazione. Nel Capitolo 2, diverse forme d'onda, durate e ampiezze sono state analizzate sia per la stimolazione in tensione, che per quella in corrente. L'*axon initial segment* è stato dimostrato essere il sito di stimolazione più efficace e la sua maturazione nel tempo è andata di pari passo con il decremento dell'ampiezza necessaria per evocare un potenziale d'azione.

I Capitoli 3 e 4 della tesi presentano due studi su nuovi parametri elettrofisiologici, o metriche, che possono essere usati per determinare il fenotipo e gli stadi di maturazione di linee neuronali cellulari differenti e per analizzare gli effetti di farmaci. Ad oggi, differenze elettrofisiologiche e effetti di farmaci sono per lo più studiati facendo uso di metriche standard, come il numero delle oscillazioni di un network neuronale o il numero di potenziali d'azione registrati, che non

consentono analisi dettagliate come l'alta risoluzione fornita dagli HD-MEAs a tecnologia CMOS.

In particolare nel Capitolo 3 sono presentati parametri elettrofisiologici, sia nuovi che comunemente usati, per lo studio di network, singoli neuroni e compartimenti subcellulari. Queste metriche sono state usate per caratterizzare e comparare efficacemente linee cellulari umane di neuroni dopaminergici e motoneuroni, derivate da cellule staminali pluripotenti indotte (dall'inglese *induced.pluripotent stem cell*, iPSC). La stessa caratterizzazione è stata fatta per le corrispettive linee isogeniche che rappresentano il Parkinson e la sclerosi laterale amiotrofica. Le metriche sono state infine usate per caratterizzare gli effetti di diversi dosaggi di un farmaco in modo altamente riproducibile.

Nel Capitolo 4 è presentato lo studio di cellule staminali neurali differenziate per 2, 4 e 7 mesi fino a raggiungere lo stadio di network maturi di neuroni. Le cellule sono poi state trasferite su HD-MEAs. Metriche aggiuntive, rispetto a quelle presentate nel Capitolo 3, sono state utilizzate per caratterizzare i tre stati di maturazione (2, 4 e 7 mesi) dal punto di vista del network, del singolo neurone e dei compartimenti subcellulari. La caratterizzazione è stata completata grazie a ulteriori analisi a mezzo del sequenziamento dell'RNA a singola cellula.

La tesi si conclude con prospettive future riguardanti l'utilizzo degli HD-MEAs nel campo dello screening di farmaci ad elevato contenuto di informazioni.