

Hilfsuntereinheiten kontrollieren Funktion und subzelluläre Verteilung von AMPA-Rezeptoren in NG2-Gliazellen des sich entwickelnden Hippokampus

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Stefan Ulrich Hardt

aus Köln

2024

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Christian Steinhäuser
2. Gutachter: Prof. Dr. Oliver Brüstle

Tag der Mündlichen Prüfung: 16.01.2024

Aus dem Institut für Zelluläre Neurowissenschaften
Direktor: Prof. Dr. Christian Henneberger

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	4
1.	Deutsche Zusammenfassung	7
1.1	Einleitung	7
1.2	Fragestellung und eigener Anteil an gemeinsamen Experimenten	11
1.3	Material und Methoden	12
1.4	Ergebnisse	19
1.5	Diskussion	23
1.6	Zusammenfassung	28
1.7	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	29
2.	Veröffentlichung	40
	Abstract	41
	Introduction	42
	Materials and Methods	42
	Results	44
	Discussion	50
	References	55
3.	Danksagung	58

Abkürzungsverzeichnis

ACSF	Künstlicher Liquor (artificial cerebrospinal fluid)
ACTB	Aktin β (actin β)
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure (α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid)
AMPAR	AMPA-Rezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA	1,2-Bis-(2-aminophenoxy)-ethan- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure (1,2-bis(2-Aminophenoxy)ethane- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid)
CA	Ammonshorn (cornu ammonis)
CACNG	Hilfsuntereinheit γ des spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanals (Ca^{2+} voltage-gated channel auxiliary subunit γ)
CP-AMPAR	Ca^{2+} -permeabler AMPA-Rezeptor
CI-AMPAR	Ca^{2+} -impermeabler AMPA-Rezeptor
CNIH	Cornichon Homolog
CTZ	Cyclothiazid
DEPC	Diethyldicarbonat (diethyl pyrocarbonate)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
EPSC	Erregender postsynaptischer Strom (excitatory postsynaptic current)
EPSP	Erregendes postsynaptisches Potenzial (excitatory postsynaptic potential)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EZD	Extrazelluläre Domäne

EYFP	Verbessertes gelb fluoreszierendes Protein (enhanced yellow fluorescent protein)
FACS	Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell sorting)
GABA	γ -Aminobuttersäure (γ -aminobutyric acid)
GRIA	Untereinheit des ionotropen Glutamat-Rezeptor des AMPA-Subtyps (glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit)
GluA	Untereinheit des Glutamat-Rezeptors des AMPA-Subtyps
HBSS	Hanks ausgewogene Salzlösung (Hanks' balanced salt solution)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
IZD	Intrazelluläre Domäne
K _{IR}	Einwärts gleichrichtender K ⁺ -Kanal (inwardly rectifying K ⁺ channel)
LBD	Liganden-Bindungsdomäne
LTP	Langzeitpotenzierung
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
Naspm	1-Naphtylacetyl-Spermin
NBQX	1,2,3,4-Tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxo-benzo[f]chinoxalin-7-sulfonamid
NG2	Neurales / gliales Antigen 2
NMDA	<i>N</i> -Methyl-D-Aspartat
NMDG	<i>N</i> -Methyl-D-Glucamin
NTD	N-terminale Domäne
OPC	Vorläuferzelle für Oligodendrozyten (oligodendrocyte precursor cell)

PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDGFR α	Plättchen-abgeleiteter Wachstumsfaktor-Rezeptor α (platelet-derived growth factor receptor α)
PDZ	Postsynaptic density (PSD) 95, Drosophila discs large homolog (Dlg) 1 and Zonula-occludens 1 protein (zo1)
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR (reverse transcriptase PCR)
Str.	Schicht (stratum)
RI	Rektifikationsindex
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
TARP	Transmembranöses Regulationsprotein des AMPA-Rezeptors (transmembrane AMPA-receptor regulatory protein)
TEA	Tetraethylammoniumchlorid
TMD	Transmembran-Domäne
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

NG2-Gliazellen und neurogliale Synapsen im Hippokampus

NG2-Gliazellen werden als einzige nicht-neuronale Zellen im Gehirn direkt von Neuronen synaptisch innerviert (Bergles et al., 2000; Jabs et al., 2005; Haberlandt et al., 2011). Durch die Expression spannungsabhängiger Na⁺-, K⁺- und Ca²⁺-Kanäle bieten sie ein „komplexes“ elektrophysiologisches Strommuster, das sie von anderen Glia abgrenzt (Haberlandt et al., 2011; Steinhäuser et al., 1994). Sie sind eine distinkte Klasse der Glia (Steinhäuser und Dietrich, 2015). Ubiquitär im ZNS verteilt, weisen sie regionsspezifische Unterschiede auf. In der weißen Substanz fungieren sie als Vorläuferzellen für Oligodendrozyten (OPC). Nach Differenzierung in Oligodendrozyten verlieren sie ihre synaptischen Verbindungen (Kukley et al., 2010). Im Hippokampus und in anderen Hirnregionen der grauen Substanz hingegen bewahren NG2-Gliazellen ihren spezifischen Phänotyp bis ins Erwachsenenalter (Dimou et al., 2008; Zhou et al., 2006). Die Relevanz der neuroglialen Synapse in diesen Hirnregionen ist weitgehend unerforscht (Steinhäuser und Dietrich, 2015). Der Hippokampusformation kommt eine besondere Bedeutung für die Funktion des ZNS zu, da sie essenziell für die Übertragung von Informationen aus dem Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis ist. Die Langzeitpotenzierung (LTP) gilt als zelluläres Korrelat dieses Vorgangs, der auch als Gedächtniskonsolidierung bezeichnet wird (Mense, 2010). Timmermann et al. (2023) zeigen, dass eine gestörte Funktion hippocampaler NG2-Gliazellen zu einer mangelnden LTP an neuroneuronalen Synapsen führt. NG2-Gliazellen und ihre neuroglialen Synapsen scheinen somit eine wichtige Voraussetzung regelrechter Hirnfunktion darzustellen.

NG2-Gliazellen verfügen über funktionelle AMPA-Rezeptoren (AMPA). AMPAR zeichnen sich durch eine besonders rasche Kinetik aus. Sie sind daher unerlässlich für eine schnelle synaptische Informationsübertragung (Traynelis et al., 2010). Im Gegensatz zu den meisten neuronalen AMPAR sind NMDA-Rezeptoren permeabel für Ca²⁺. Ihre Aktivierung setzt aber u. a. eine Koaktivierung durch ein erregendes postsynaptisches Potenzial (EPSP) voraus, da ihre Ionenkanalporen im Ruhezustand durch extrazelluläres Mg²⁺ blockiert werden (Hansen et al., 2021). Eine Subgruppe von AMPAR ist jedoch

selbst Ca^{2+} -permeabel (CP-AMPA) und kann daher unmittelbar die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration steigern. Haberlandt et al. (2011) zeigen, dass NG2-Gliazellen neben spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen und metabotropen Glutamat-Rezeptoren auch funktionelle CP-AMPA exprimieren. Der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration setzt weitere Signalwege in Gang, die z. B. LTP der neuroglialen Synapse verursachen (Ge, 2006). Es gibt jedoch auch eine wachsende Evidenz einer pathophysiologischen Relevanz der CP-AMPA und der durch sie vermittelten Exzitotoxizität. Dies betrifft eine Reihe zentralnervöser Krankheiten wie den ischämischen Schlaganfall, Status epilepticus oder Schädel-Hirn-Traumata, aber auch hirneigene Tumore wie Glioblastome (Weiss, 2011).

AMPA-Rezeptoren

Synaptische Plastizität gilt als molekulares Korrelat von Lernen und Gedächtnis. Sie wird entscheidend durch numerische Alteration postsynaptischer AMPAR und auch durch Modulation der biophysikalischen Rezeptoreigenschaften vermittelt (Greger et al., 2017). Der Steuerung des An- und Abtransports zur postsynaptischen Membran kommt daher große Bedeutung zu (Bissen et al., 2019). Die Rezeptoreigenschaften werden durch die molekulare Struktur der Untereinheiten, aber auch durch die Interaktion mit regulatorischen Proteinen und deren Stöchiometrie beeinflusst (Milstein et al., 2007). Vier Gene (GRIA1, GRIA2, GRIA3, GRIA4) kodieren jeweils eigene Rezeptor-Untereinheiten (GluA1, GluA2, GluA3, GluA4). Im endoplasmatischen Retikulum (ER) werden sie zu einem Tetramer zusammengesetzt (Abb. 1). Das Tetramer interagiert hier bereits mit regulatorischen Proteinen, die den weiteren Transport steuern und teils integraler Teil des Rezeptors werden (Abb. 2).

AMPA, die nur GluA1, GluA3 und/oder GluA4 enthalten, bilden Ca^{2+} -permeable Ionenkanalporen (CP-AMPA). Eine posttranslationale Editierung in GluA2 führt hingegen regelhaft zum Verlust der Ca^{2+} -Permeabilität des GluA2-enthaltenden AMPAR (CI-AMPA, Abb. 3). CP-AMPA werden bei depolarisierten Membranpotentialen durch das intrazelluläre Polyamin Spermin inhibiert (Bowie und Mayer, 1995; Donevan und Rogawski, 1995; Kamboj et al., 1995). Daraus resultiert eine einwärtsgerichtete Strom-Spannungskurve (Koh et al., 1995; Tóth und McBain, 1998; Soto et al., 2007). Dieser Effekt wird durch GluA2 unterbunden. Es resultiert eine annähernd lineare Strom-Spannungskurve (Bowie und Mayer, 1995; Washburn et al., 1997).

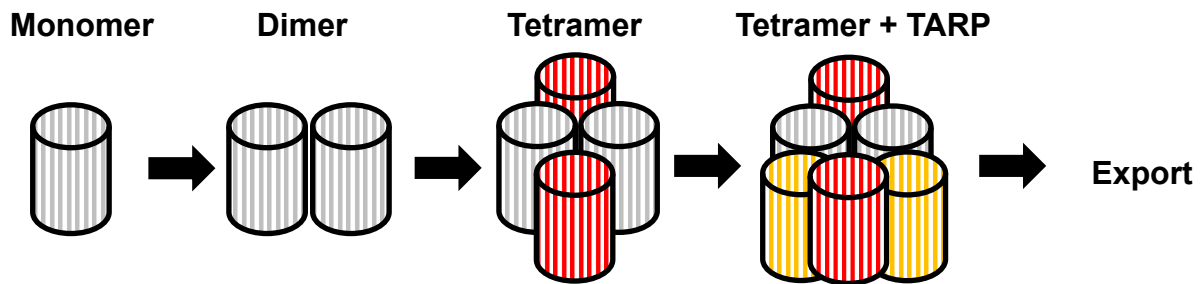


Abb. 1: Schematische Darstellung der AMPAR-Assemblierung im ER (modifiziert nach Ziff, 2007). Eine Untereinheit GluA (grau, Monomer) wird mit einem weiteren Monomer derselben Art zu einem Dimer zusammengesetzt. Das Dimer wird mit einem zweiten Dimer einer anderen Klasse (rot) zu einem Tetramer zusammengefügt (Sobolevsky et al., 2009). Ein AMPAR interagiert mit bis zu vier TARP (gelb).

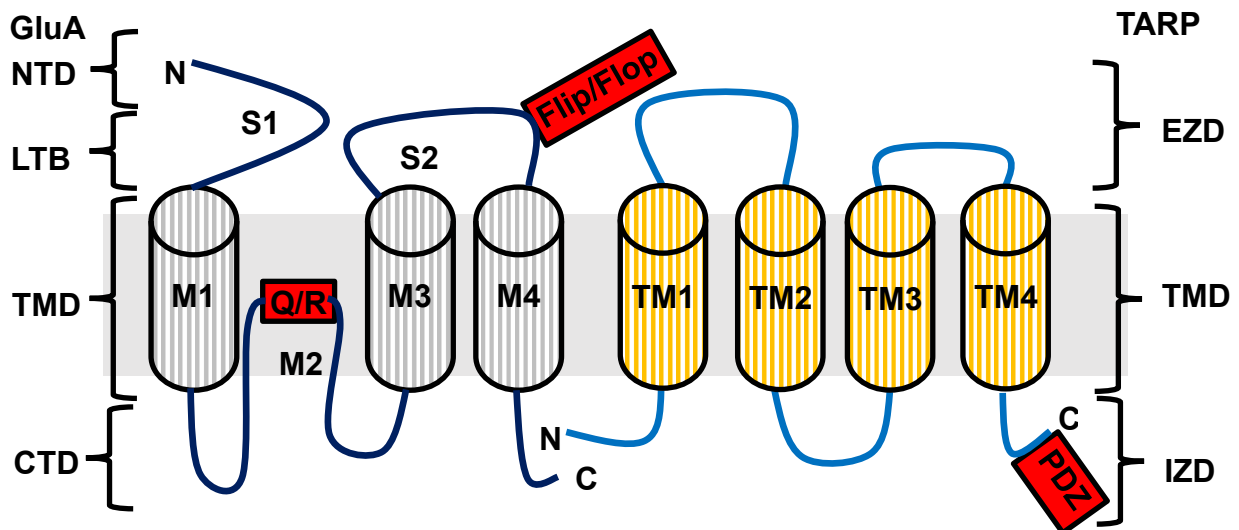


Abb. 2: Schematische Darstellung einer GluA-Untereinheit und eines TARPs (modifiziert nach Hansen et al., 2021; Jackson und Nicoll, 2011). Eine GluA-Untereinheit (links) liegt in der Zellmembran (grauer Balken) unmittelbar neben einem TARP (rechts). Eine GluA-Untereinheit verfügt über eine extrazelluläre N-terminale Domäne (NTD), die wichtig für die Rezeptorzusammensetzung sowie für den Transport ist. Die Liganden-Bindungsdomäne (LBD) wird durch die Polypeptidketten S1 und S2 gebildet. Die Flip-Flop-Stelle in S2 unterliegt alternativem Spleißen und beeinflusst die Rezeptor-Pharmakokinetik (Seifert et al., 2002). Die Transmembran-Domäne (TMD) besteht aus den Helices M1, M3 und M4 sowie der Schleife M2. Die Q/R-Stelle in M2 wird im Fall der GluA2-Untereinheit posttranslational editiert. Die intrazelluläre C-terminale Domäne (CTD) unterliegt posttranslationaler Modifikation. Das TARP verfügt über eine TMD, die sich aus den transmembranösen Helices TM1-TM4 zusammensetzt. Zwischen TM1 und TM2 liegt eine große Schleife, die die extrazelluläre Domäne (EZD) bildet und die Rezeptor-Öffnung und -Schließung moduliert. Die intrazelluläre Domäne (IZD) besteht u. a. aus einer CTD mit einem PDZ-Bindungsmotiv, das mit dem postsynaptischen Protein-Komplex interagiert und für die synaptische Lokalisation essenziell ist (Chen et al., 2000; Schnell et al., 2002).

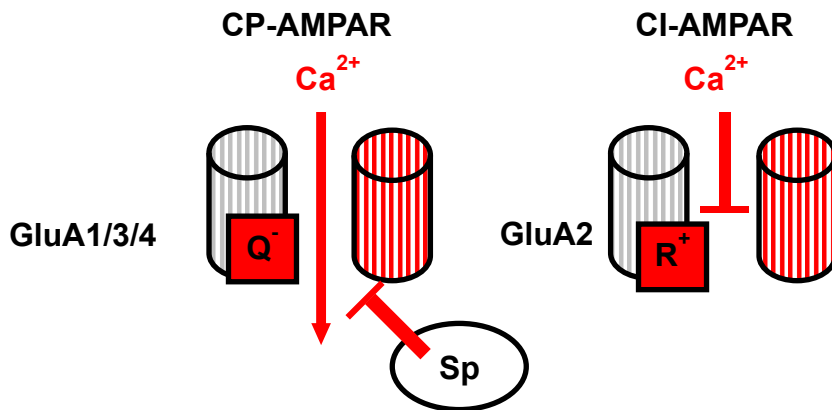


Abb. 3: Schematische Darstellung von CP-AMPA und CI-AMPA (modifiziert nach Hansen et al., 2021). AMPAR ohne GluA2 sind Ca²⁺-permeabel (CP-AMPA) und unterliegen einem spannungsabhängigen Block durch intrazelluläre Polyamine wie Spermin (Sp) (Bowie und Mayer, 1995; Donevan und Rogawski, 1995; Kamboj et al., 1995). Daraus resultiert eine einwärtsgerichtete Strom-Spannungskurve (Koh et al., 1995; Tóth und McBain, 1998; Soto et al., 2007). Dieser Effekt wird durch GluA2 unterbunden (Bowie und Mayer, 1995; Washburn et al., 1997). In GluA2 führt eine RNA-Editierung zum Austausch der negativ geladenen Aminosäure Glutamin (Q⁻) durch positiv geladenes Arginin (R⁺). AMPAR, die GluA2 enthalten, sind daher impermeabel für Ca²⁺ (CI-AMPA) und unterliegen keinem Polyamin-Block.

Hilfsproteine des AMPA-Rezeptors

Transmembranöse Regulationsproteine des AMPAR (TARP) erweitern die bisher beschriebene molekulare Komplexität (Greger et al., 2017). Das erste Hilfsprotein des AMPAR wird in der natürlich vorkommenden Maus-Mutante Stargazer (etwa „Sterndeuter“) beschrieben. Es wird als TARP γ 2 oder Stargazin bezeichnet (Greger et al., 2017). Stargazer-Mäuse scheinen nach den Sternen zu trachten, ein Verhalten, das Absenzen entspricht. Letts et al. (1998) identifizieren eine Mutation im TARP γ 2 kodierenden Gen, das sie aufgrund struktureller Ähnlichkeit mit der γ -Untereinheit der spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanäle (CACNG) als CACNG2 bezeichnen. Infolge dieses Defekts kommt es an der Moosfaser-Körnerzell-Synapse zu einem Verlust der schnellen EPSC-Komponente, die durch AMPAR vermittelt wird (Hashimoto et al., 1999). Tomita et al. (2003) haben nachfolgend TARP γ 3 bis γ 8 identifiziert. TARP werden zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten, aber auch in unterschiedlichen Hirnregionen, Zelltypen und intrazellulären Lokalisationen exprimiert (Mauric et al., 2013; Tomita et al., 2003). Die künstliche Expression von TARP γ 3, γ 4 und γ 8 kuriert den Phänotyp der Stargazer-Maus; aufgrund dieser Tatsache und weiterer funktioneller Ähnlichkeiten werden sie als Klasse

I zusammengefasst, $\gamma 5$ und $\gamma 7$ als Klasse II (Kato et al., 2008). TARP $\gamma 1$ und $\gamma 6$ werden im Gehirn nicht exprimiert. Ein AMPAR interagiert mit bis zu vier TARP- $\gamma 2/\gamma 3$ - oder mit bis zu zwei TARP- $\gamma 4/\gamma 8$ -Untereinheiten (Ben-Yaacov et al., 2017).

Wie Greger et al. (2017) und Bissen et al. (2019) in ihren Übersichtsarbeiten zusammenfassen, erfüllen TARP kritische Funktionen in der Regulation des intrazellulären Rezeptor-Transportes, der Verankerung und Stabilität in der Zellmembran sowie des Recyclings. Über ein PDZ-Bindungsmotiv können sie direkt mit Proteinen des postsynaptischen Proteinkomplexes interagieren (Chen et al., 2000; Schnell et al., 2002). Darüber hinaus beeinflussen TARP die Pharmakodynamik und -Kinetik (Jackson und Nicoll, 2011). Die Deaktivierung und Desensitivierung wird verlangsamt und Kainat wirkt effektiver (Tomita et al., 2005). Der Polyamin-Block von CP-AMPAR wird beeinflusst und die Kanalleitfähigkeit gesteigert (Jackson et al., 2011; Soto et al., 2007). TARP interagieren dabei unmittelbar mit TMD der AMPAR-Untereinheiten (Ben-Yaacov et al., 2017; Twomey et al., 2016).

Proteomische Untersuchungen haben weitere Hilfsproteine der AMPAR identifiziert (Greger et al., 2017): Cornichon Homologe (CNIH) sind Transmembranproteine, die beim Sortieren im ER involviert sind und als Chaperone die Membranexpression bewirken. Außerdem modulieren sie Rezeptoreigenschaften: Sie verlangsamen das Öffnen und Schließen der Ionenkanalpore. Sie verstärken auch den Effekt des allosterischen Modulators Cyclothiazid (CTZ) in solchen Zellen, in denen auch TARP $\gamma 8$ exprimiert wird (Schwenk et al., 2009; Shi et al., 2010; Gill et al., 2012; Greger et al., 2017).

1.2 Fragestellung und eigener Anteil an gemeinsamen Experimenten

Fragestellung

Hippokampale NG2-Gliazellen exprimieren heteromere AMPAR der Untereinheitenzusammensetzung GluA1-4 (Seifert et al., 1997a; Seifert et al., 2003; Hardt et al., 2021). Die funktionelle Vielfalt der AMPAR wird durch die Interaktion mit regulatorischen Proteinen noch erheblich erweitert.

Die Hauptfrage meiner Arbeit war daher, welche regulatorischen Untereinheiten des AMPAR in hippokampalen NG2-Gliazellen exprimiert werden.

NG2-Gliazellen des Hippokampus weisen in der frühen postnatalen Entwicklung Unterschiede in der Spleißvariantenexpression und der Ca^{2+} -Permeabilität auf, die in adulten Mäusen abnimmt (Seifert et al., 1997a; Seifert et al., 2003; Hardt et al., 2021). Ich wollte daher insbesondere auch untersuchen, ob die Expression regulatorischer Proteine des AMPAR in der postnatalen Entwicklung reguliert wird.

Einige TARP ($\gamma 2$, $\gamma 5$, $\gamma 7$) beeinflussen auf indirekte Weise die Ca^{2+} -Permeabilität durch Regulation der Oberflächenexpression der jeweiligen Untereinheiten (Kott et al., 2009; Soto et al., 2009; Studniarczyk et al., 2013). Eine weitere Fragestellung war daher, ob eine Korrelation zwischen der Expression von CP-AMPAR und diesen TARP besteht. Außerdem wollte ich herausfinden, ob CP-AMPAR und CI-AMPAR separat in Zellen exprimiert sind oder relativ homogene AMPAR-Komplexe mit mittlerer Ca^{2+} -Permeabilität in NG2-Gliazellen vorliegen.

Eigener Anteil an gemeinsam durchgeführten Experimenten

Die im nächsten Abschnitt genannten Untersuchungen wurden durch mich selbstständig durchgeführt und ausgewertet. Ergänzend dazu führte ich folgende Experimente in Zusammenarbeit mit Mitgliedern der Arbeitsgruppe durch, die auch als AutorInnen meiner Publikation aufgeführt sind: molekularbiologische Untersuchungen (Dr. Seifert), Sammeln von Zellen für die Einzelzell-PCR (Dr. Passlick) und Auslösung postsynaptischer AMPAR-Ströme (Hr. Tascio, Dr. Timmermann). Die Experimente an isolierten Zellen wurden durch Dr. Seifert durchgeführt. Statistische Auswertungen erfolgten mit Dr. Jabs und Dr. Seifert.

1.3 Material und Methoden

Präparation akuter hippocampaler Schnitte

Zur Identifikation von NG2-Gliazellen nutzte ich Gewebeschnitte der transgenen Mauslinie NG2ki-EYFP, in der EYFP unter dem NG2-Promoter als knock-in exprimiert wird (Karram et al., 2008). NG2-positive Zellen können in dieser Mauslinie anhand des Fluoreszenz-Signals identifiziert werden. Um Unterschiede im Rahmen der Entwicklung untersuchen zu können, verwendete ich Mäuse zweier Altersgruppen (juvenil, p6-p12, und adult, p40-p76). Meine Versuche waren nicht genehmigungspflichtig, da ich Mäuse lediglich zur Organentnahme tötete. Zur Vorbereitung der Tötung versetzte ich die Mäuse

mit dem Anästhetikum Isofluran in eine tiefe Narkose. Sobald die Mäuse komatös waren, dekapitierte ich sie, präparierte rasch ihre Gehirne und verbrachte diese in eine eiskalte Präparationslösung. Die Präparationslösung wurde konstant mit Carbogen (Gasgemisch aus 95 % CO₂ und 5 % O₂) begast und enthielt (in mM): 87 NaCl, 2,5 KCl, 1,25 NaH₂PO₄, 7,0 MgSO₄, 0,5 CaCl₂, 25 Glukose, 25 NaHCO₃ und 105 Sucrose (Osmolarität 325 mOsm, pH 7,4). Für elektrophysiologische Experimente schnitt ich das Großhirn mit einem Vibratom in 300 µm dicke Schichten frontaler oder horizontaler Orientierung. Die Schnitte verbrachte ich auf ein feines Netz. In derselben Lösung wurden sie für mindestens 30 min bei 35 °C inkubiert. Anschließend lagerte ich die Schnitte in künstlichem Liquor (ACSF) bei 25 °C. ACSF wurde ebenfalls konstant mit Carbogen begast und enthielt (in mM): 126 NaCl, 3,0 KCl, 1,25 NaH₂PO₄, 2,0 MgCl₂, 2,0 CaCl₂, 10 Glukose, 26 NaHCO₃ (Osmolarität 310 mOsm, pH 7,4).

Elektrophysiologische Charakterisierung mittels der Patch-Clamp-Methode

Für die Messungen verbrachte ich die Schnitte in eine konstant mit ACSF durchströmte Badkammer. Diese ruhte auf einem schwingungsgedämpften Tisch und wurde durch einen Faraday-Käfig abgeschirmt. Mithilfe eines Mikroskops suchte ich zunächst das Str. radiatum der CA1-Region im Hippokampus auf. NG2-Gliazellen konnte ich aufgrund ihrer charakteristischen Morphologie, ihres EYFP-Signals sowie des komplexen Strommusters identifizieren. Um Verwechslungen mit NG2-positiven Perizyten zu vermeiden, analysierte ich keine Zellen, die unmittelbar an Blutgefäße angrenzten. Für die Messungen verwendete ich die Patch-Clamp-Technik, die das Erfassen von Strömen über die Membran einer Zelle ermöglicht. Die Patch-Pipette stellte ich unmittelbar vor den Experimenten aus Borosilikatglas her und befüllte sie mit einer intrazellulären Lösung (s. u.). Die Messelektrode bestand aus einem feinen chlorierten Silberdraht und war mit einem Vor- und Hauptverstärker verbunden. Ich spannte die Patch-Pipette in einen Pipetten-Halter, wodurch die Messelektrode in die intrazelluläre Lösung eingeführt wurde. Dann erzeugte ich über ein verbundenes Schlauchsystem mit einem U-Rohr einen Überdruck und führte die Patch-Pipette in die Badlösung ein. In der Badlösung wurde eine Referenzelektrode platziert. Die Ströme wurden gefiltert (Tiefpass-Filter mit Grenzfrequenz von 3 kHz oder 10 kHz) und durch ein mit einem Computer verbundenes Interface bei einer Sampling-Frequenz von 10 kHz bis 100 kHz abgetastet. Das Interface diente gleichzeitig als Stimulus-

Generator. Zunächst überprüfte ich durch kurze Potenzialänderungen um 10 mV den Widerstand der Messelektrode (2,0 bis 4,0 MΩ). Den Widerstand R bestimmte ich nach dem Ohm'schen Gesetz (s. u.). In der Spannungsklemme (Voltage-Clamp-Modus) wählte ich als Haltepotenzial -70 mV. Das Grenzflächenpotenzial zwischen Badlösung und intrazellulärer Lösung (liquid junction potential) berechnete und korrigierte ich. Mithilfe eines Mikromanipulators führte ich unter mikroskopischer Kontrolle die Spitze der Patch-Pipette unmittelbar an eine Zelle im Hirnschnitt heran. Durch Unterdruck erzeugte ich eine sehr enge Verbindung zur Zellmembran (Cell-Attached-Konfiguration). Sobald ich einen Widerstand zur Badlösung von >1000 MΩ (Gigaseal) erreichte, zerstörte ich den Patch durch weitere pulsatile Applikation von Unterdruck (Whole-Cell-Konfiguration). In der Stromklemme (Current-Clamp-Modus) bestimmte ich das Membranpotenzial. Die Membrankapazität und den Serienwiderstand ermittelte ich durch ein von Dr. R. Jabs programmiertes Makro (Igor Pro, Wavemetrics). Kapazitätsartefakte kompensierte ich durch entsprechende de- oder hyperpolarisierende Impulse. Zur Erfassung des elektro-physiologischen Strommusters veränderte ich das Haltepotenzial in Schritten von 10 mV für jeweils 50 ms. Den Eingangswiderstand der Zelle R ermittelte ich nach dem Ohm'schen Gesetz gemäß

$$R = \frac{U}{I} . \quad (1)$$

Dabei ist U die Potentialdifferenz und I die gemessene Stromstärke nach 50 ms.

Pharmakologische Untersuchung der AMPAR-Ströme

Um die Ströme durch AMPAR im intakten Netzwerk untersuchen zu können, applizierte ich pharmakologisch aktive Substanzen im akuten Schnitt. Über eine peristaltische Schlauchpumpe wurde die Badkammer konstant mit Badlösung durchströmt. Zur Applikation der Substanzen nutzte ich ein selbst gebautes System aus Infusionsleitungen mit Dreiwegehähnen. Nach Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration und einer elektro-physiologischen Charakterisierung wusch ich Blocker der K⁺-Kanäle (100 μM BaCl₂ und 200 μM Quinin), Na⁺-Kanäle (0,5 μM Tetrodotoxin) sowie der GABA_A-Rezeptoren (100 μM Picrotoxin) ein. Danach applizierte ich Kainat (250 μM). Kainat wirkt als Agonist am AMPAR und blockiert auf indirekte Weise K⁺-Kanäle (Jabs et al., 1994; Schröder et al., 2002). Zur Überprüfung der Ca²⁺-Permeabilität schloss ich die Applikation von Naspam an. Naspam ist

ein Analogon des Joro-Spinnen-Toxins, das selektiv CP-AMPA inhiert (Koike et al., 1997). Um sicherzustellen, dass die durch Kainat ausgelösten Ströme durch AMPAR vermittelt wurden, applizierte ich in einigen weiteren Experimenten den Antagonisten NBQX. Um den Vorgang der Applikation zu überprüfen, wurde die Zelle während der Applikation immer wieder schrittweise de- und hyperpolarisiert. Hierzu wurden ausgehend von -70 mV für eine Dauer von jeweils 100 ms die folgenden Haltepotenziale eingestellt: -70, -40, -20, 0, +20, +40, +70, +100 und -100 mV. Zwischen den Potenzialänderungen wurde das Haltepotenzial immer wieder auf -70 mV eingestellt und ein Intervall von 100 ms abgewartet. Diese Sequenz wurde dann nach 4,5 s erneut durchlaufen (Hardt et al., 2021 Fig. 2A). Die Messungen erfolgten bei 25 °C. Die intrazelluläre Lösung in der Messelektrode enthielt (in mM): 130 KCl, 0,5 CaCl₂, 2,0 MgCl₂, 5,0 BAPTA, 10 HEPES und 3,0 Na₂-ATP sowie (in µM) 50 oder 100 Spermin (pH 7,28).

Um die Wirkung der Substanzen auszuwerten, bildete ich jeweils die Differenz der Stromstärken bei den jeweiligen Haltepotenzialen vor und nach dem Einwaschen. Dann rekonstruierte ich die Strom-Spannungskurve. Das Umkehrpotential E_{REV} bestimmte ich durch lineare Regression gemäß

$$E_{REV} = U_1 - I_1 \left(\frac{U_2 - U_1}{I_2 - I_1} \right). \quad (2)$$

Dabei ist U_1 das Haltepotenzial des letzten Messpunkts mit nachweisbarem Einwärtsstrom der Stromstärke I_1 und U_2 ist das Haltepotenzial des ersten Messpunkts mit nachweisbarem Auswärtsstrom der Stromstärke I_2 .

Den Rektifikationsindex R/I berechnete ich durch Vergleich der Leitfähigkeiten bei Haltepotenzialen von -70 mV und +40 mV (Hardt et al., 2021, Formel 2). Zum Vergleich der Altersgruppen normierte ich zunächst die Strom-Spannungskurve jeder einzelnen Zelle auf die individuell maximal einwärtsgerichtete Stromstärke und rekonstruierte dann für jede Altersgruppe eine durchschnittliche Strom-Spannungskurve (Hardt et al., 2021, Fig. 2F). Die Stromdichte j berechnete ich gemäß

$$j = \frac{I}{C}. \quad (3)$$

Dabei ist I die Stromstärke des Kainat-evozierten Stroms bei einem Haltepotenzial von -70 mV und C ist die Membrankapazität der betreffenden Zelle.

Für die Aufzeichnung postsynaptischer Ströme wurde der Badlösung CTZ zugesetzt. CTZ ist ein allosterischer Modulator, der AMPAR-Ströme selektiv potenziert. Es erfolgte eine Stimulation der Schaffer-Kollateralen. Hierzu wurde eine monopolare Elektrode (chlorierter Silberdraht in ASCF-gefüllter Glas-Kapillare mit niedrigem Widerstand ($<1 \text{ M}\Omega$)) in einem Abstand von etwa $60 \mu\text{m}$ von der Zelle platziert. Die Stimulationspulse dauerten $100 \mu\text{s}$ und wurden in Paaren appliziert (Latenz zwischen zwei Stimuli: $50 \mu\text{s}$). Die Amplitude wurde so weit verringert, bis gerade noch eine Antwort ausgelöst wurde (minimale Stimulation). Die Stimulationsartefakte wurden offline kompensiert und die postsynaptischen Ströme in dafür programmierten Makros analysiert (Igor Pro, Wavemetrics). Bei diesem Experiment erfolgten die Messungen bei $35 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Schnitte wurden nicht in den weiter oben genannten blockierenden Substanzen inkubiert, da dies auch die Signalweiterleitung an den Schaffer-Kollateralen unterbunden hätte. Stattdessen wurde eine intrazelluläre Lösung benutzt, in der KCl durch 120 mM CsCl ersetzt wurde (Hardt et al., 2021). Diese enthielt (in mM): 120 CsCl , 2 MgCl_2 , $0,5 \text{ CaCl}_2$, 5 BAPTA , 10 HEPES , $3 \text{ Na}_2\text{-ATP}$, 10 TEA .

Zur Untersuchung frisch isolierter Zellen wurden akute Schnitte mit der Protease Papain behandelt (Matthias et al., 2003). Die isolierten Zellen wurden mit einer speziellen Pipetten-Elektrode in verschiedene Badlösungen überführt, die K^+ -Kanal-Blocker (Quinin und BaCl_2 , $100 \mu\text{M}$ jeweils) sowie Agonisten, Antagonisten und Modulatoren des AMPAR enthielten (Seifert und Steinhäuser, 1995). Die Badlösung enthielt (in mM) 150 NaCl , $5,0 \text{ KCl}$, $2,0 \text{ MgCl}_2$, $2,0 \text{ CaCl}_2$, 10 HEPES und 10 Glukose (pH 7,4). Für die Messungen in Na^+ -freier Lösung wurde NaCl durch 50 mM CaCl_2 und NMDG ersetzt (Osmolarität 320 mOsm , pH 7,4). Die Messungen erfolgten bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Der Permeabilitätskoeffizient $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Cs}}$ wurde nach der Goldman-Gleichung berechnet (modifiziert nach Mayer und Westbrook, 1987; Seifert und Steinhäuser, 1995) gemäß

$$\frac{P_{\text{Ca}}}{P_{\text{Cs}}} = - \left(\frac{1}{4[\text{Ca}^{2+}]_o} \right) \left(- \left(\frac{1}{4a} \right) \left(\left(2ae^{\frac{EF}{RT}} + b \right)^2 - b^2 \right) + [\text{K}^+]_o \right), \quad (4)$$

mit

$$a = [\text{Cs}^+]_i, \quad b = [\text{Cs}^+]_i - [\text{K}^+]_o.$$

Dabei ist E das Umkehrpotenzial des Kainat-evozierten Stroms, F die Faraday-Konstante, R die allgemeine Gaskonstante und T die absolute Temperatur.

Molekularbiologische Untersuchungen auf Einzelzellebene

Für die Polymerasekettenreaktion mit reverser Transkriptase (RT-PCR) auf Einzelzellebene hob ich NG2-Gliazellen unter mikroskopischer Kontrolle mit der Spitze der Patch-Pipette aus dem Schnitt heraus und aspirierte sie in die Pipette. Um Kontaminationen mit anderen Zelltypen zu vermeiden, wurden alle Zellen verworfen, die in der optischen Kontrolle noch von Gewebestücken umgeben waren. Die Identifikation der Zellen erfolgte wie oben beschrieben. Die somit „geerntete“ Zelle und 3 µl der intrazellulären Lösung überführte ich in ein Reaktionsgefäß, das mit 3 µl DEPC-behandeltem Wasser versetzt war. Diethylcarbonat (DEPC) inaktiviert Ribonukleasen. Das Gefäß wurde tiefgefroren und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert.

Der RT-Mastermix enthielt Erst-Strang-Puffer, Dithiothreitol (10 mM), dNTP (4 x 250 µM), RNasin (20 U), Random Hexamer Primer (50 µM) und reverse Transkriptase (Superscript III, 100 U). Der Mastermix wurde dem Reaktionsgefäß hinzugefügt (Endvolumen 10 µl) und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte eine zweizügige Nested-Multiplex-PCR mit Primern für TARP, CNIH-2 und PDGFR α . In der ersten PCR wurden PCR-Puffer, MgCl₂ (2,5 mM), dNTP (4 x 50 µM), Primer (jeweils 200 nM) und Taq-Polymerase (5 U) zum RT-Produkt hinzugefügt (Endvolumen 50 µl). Es wurden 35 Zyklen zur Gen-Amplifizierung durchlaufen (Denaturierung bei 94 °C für 25 s; Primer-Hybridisierung bei 51 °C für 2 min in den ersten fünf Zyklen, dann für 45 s in den restlichen Zyklen; Elongation bei 72 °C für 25 s; letzte Elongation für 7 min). Ein Aliquot (2 µl) des PCR-Produkts diente als Matrize für die zweite PCR und es wurden eingerückte ‚Nested‘-Primer benutzt (35 Zyklen; Denaturierung bei 54 °C für 2 min in den ersten fünf Zyklen, dann für 45 s in den restlichen Zyklen). Die weiteren Bedingungen entsprachen der ersten PCR, aber es wurde Platinum-Taq-Polymerase (2,5 U) hinzugefügt. Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese identifiziert. Als Positiv-Kontrolle diente unspezifische Maushirn-RNA, als Negativ-Kontrolle destilliertes Wasser oder die Badlösung, die bei den elektrophysiologischen Messungen verwendet wurde.

Molekularbiologische Untersuchungen auf Populationsebene

Für die Durchflusszytometrie (FACS) wurde als Erstes der Hippokampus unter einem Mikroskop präpariert. Um die Zellen aus dem Gewebeverbund zu lösen, folgte ich der

Anleitung des Neural Dissociation Kit (P) der Firma Miltenyi. Zunächst zerkleinerte ich das Gewebe mechanisch. Danach inkubierte ich es in den Enzymen Papain und DNase I (37 °C, 15 min und 10 min). Durch wiederholtes Pipettieren mittels Pasteurpipetten wurden die Zellen vereinzelt, Zellbruchstücke durch Zentrifugation entfernt und das Zellpellet in Hanks ausgewogener Salzlösung (HBSS) aufgenommen. Anschließend erfolgte das FACS, bei der NG2-Gliazellen aufgrund des EYFP-Signals identifiziert und in HBSS gesammelt wurden. Zur Aufreinigung zentrifugierte ich diese Lösung (2000 g, 10 min), verwarf den Überstand und inkubierte die verbliebenen Zellen in einem Lyse-Bindungs-puffer. Zur Lagerung verbrachte ich die Lösung in flüssigen Stickstoff und frore sie bei -80 °C ein.

Zur Aufreinigung der mRNA nutzte ich magnetische Dynabeads. Diese waren mit Oligo(dT)₂₅ verbunden und banden somit an das Poly(A)-Ende der mRNA. Die Dynabeads mit der adhären mRNA suspendierte ich in 20 µl DEPC-Wasser. Es erfolgte dann eine Reverse-Transkriptase-Reaktion unter Verwendung von Oligo(dT)₂₄-Primer (5 µM, Inkubation bei 50 °C für 1 h). Zur Quantifizierung folgte eine quantitative Echtzeit-PCR. Hierzu wurde der Takyon-Real-Time-PCR-Mastermix verwendet. Zur Fluoreszenz-Bildung diente eine TaqMan-Sonde. Pro Gen wurden drei Proben gleichzeitig analysiert. Nach der initialen Denaturierung (95 °C, 10 min) wurden 50 Zyklen durchlaufen (Denaturierung bei 95 °C für 15 s, Primer-Hybridisierung und Amplifikation bei 60 °C für 60 s). Die Fluoreszenz wurde bei jedem Zyklus während des Amplifizierungsschrittes ausgelesen. Zur Auswertung wurde zunächst bestimmt, mit welcher Effizienz die Gene jeweils amplifiziert wurden. Zur relativen Quantifizierung nutzte ich eine Abwandlung der $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Hardt et al., 2021, Formel 1). Als interne Kontrolle zur relativen Quantifizierung diente das Referenzgen ACTB, das β -Aktin kodiert. Die Transkription der Gene wurde so mit der Transkription von ACTB ins Verhältnis gesetzt.

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit R (www.R-project.org). Zunächst überprüfte ich die Daten mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung und mit dem Levene-Test auf Gleichheit der Varianzen. Dann schloss ich einen Zweistichproben-*t*-Test, bei ungleichen Varianzen einen Welch-Test bzw. bei nicht-parametrischen Daten einen Mann-Whitney-U-Test an. Für gepaarte Daten führte ich einen abhängigen *t*-Test bzw.

bei nicht-parametrischen Daten einen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test durch. Zum Vergleich mehrerer Gruppen verwendete ich (zweifaktorielle) Varianzanalysen. Als Post-Hoc-Tests dienten der Tukey-Test oder der Holms-Post-Hoc-Test. Für nicht-parametrische Daten erfolgten Varianzanalysen nach angepasster Rang-Transformation gefolgt von Mann-Whitney-U-Tests oder Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests. Zur Korrektur der Alpha-fehler-Kumulierung verwendete ich jeweils die Holm-Korrektur. Zur Analyse der Expressionsfrequenzen in Einzelzellen benutzte ich den Chi-Quadrat-Test.

1.4 Ergebnisse

Pharmakologische Untersuchung der AMPAR-Ströme im akuten hippokampalen Schnitt

In einem ersten Schritt wollte ich untersuchen, wie sich die Ca^{2+} -Permeabilität von AMPAR in hippokampalen NG2-Gliazellen in der weiteren postnatalen Entwicklung (von juvenil, p10, bis adult, p60) verändert. Hierzu untersuchte ich NG2-Gliazellen in akuten hippokampalen Schnitten der NG2ki-YPF-Mauslinie beider Altersgruppen mittels der Ganz-Zell Patch-Clamp-Methode. Nach der visuellen und elektrophysiologischen Identifizierung der NG2-Gliazellen applizierte ich die oben beschriebene Blockerlösung mit Antagonisten von GABA_A -Rezeptoren, Na^+ - und K^+ -Kanälen über die Badlösung.

Die Applikation der Blocker depolarisiert das Membranpotential und erhöht den Eingangswiderstand der untersuchten NG2-Gliazellen. Diese Effekte sind in Zellen juveniler Mäuse stärker ausgeprägt als in denen adulter Mäuse (jeweils $p < 0,001$). Die nachfolgende Kainat-Applikation induziert in allen untersuchten Zellen AMPAR-vermittelte Einwärtsströme. Die Stromdichten unterscheiden sich nicht signifikant ($p = 0,175$) (Hardt et al., 2021, Fig. 2AC). Trotz Zusatz von $50 \mu\text{M}$ Spermin zur Pipettenlösung zeigen die Stromspannungskurven keine Blockierung auswärtsgerichteter Rezeptorströme. In der juvenilen Gruppe zeigt sich sogar eine deutliche Auswärtsrektifizierung ($\text{RI} = 1,77$, $1,60\text{--}1,94$, $n = 20$). Der RI der AMPAR-Ströme in NG2-Gliazellen von adulten Mäusen ist geringer und beträgt $1,24$ ($1,12\text{--}1,38$; $n = 41$, $N = 9$, $p < 0,001$) (Hardt et al., 2021, Fig. 2B). Eine erhöhte intrazelluläre Spermin-Konzentration von $100 \mu\text{M}$ zeigt im Vergleich zu $50 \mu\text{M}$ Spermin in der Pipettenlösung keinen signifikanten Unterschied auf die Rektifizierung der AMPAR-Ströme (Hardt et al., 2021, Fig. 2G). NBQX blockiert die durch Kainat evozierten

Ströme vollständig, was zeigt, dass diese tatsächlich durch AMPA-/Kainat-Rezeptoren vermittelt werden (Hardt et al., 2021, Fig. 2A).

Die Experimente wiesen bisher darauf hin, dass die Ca^{2+} -Permeabilität von glialen AMPAR in adulten Mäusen größer ist als in jungen Mäusen. Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wusch ich in einem nächsten Schritt Nasp_m zusammen mit Kainat über die Badlösung ein (Hardt et al., Fig. 2A). Da Nasp_m selektiv CP-AMPA_R inhibiert (Koike et al., 1997), erwartete ich einen ausgeprägteren Effekt in Zellen adulter Mäuse. Via Badlösung appliziertes Nasp_m inhibiert jedoch insgesamt nur einen geringen Anteil der durch Kainat evozierten Ströme. Beim Haltepotenzial von -100 mV zeigt sich eine Reduktion der Stromstärke um $8,1 \pm 12,1 \%$ (juvenil) respektive $15,5 \pm 16,8 \%$ (adult). Hierbei besteht kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Altersgruppen ($p = 0,201$). Das Umkehrpotenzial verschiebt sich im Mittel geringfügig weiter in den positiven Bereich (um 2,2 mV (1,3 bis 5,6) respektive um $3,8 \pm 3,4$ mV), aber der RI ändert sich kaum.

Da die intrazelluläre Applikation von Nasp_m unabhängig von der TARP-Expression sein soll (Coombs et al., 2021), ergänzte ich ein Experiment mit 100 μM Nasp_m in der Pipettenlösung. Die Kainat-Applikation unter diesen Bedingungen führt tatsächlich zu einer ausgeprägteren Blockierung der Auswärtsströme und zu einer Verkleinerung des RI sowohl in Zellen juveniler Mäuse ($\text{RI} = 1,44 \pm 0,30$, $n = 18$, $N = 3$, $p < 0,01$) als auch in denen adulter Mäuse ($\text{RI} = 1,03 \pm 0,17$, $n = 18$, $N = 3$, $p < 0,01$). In diesem Fall ist der durch Nasp_m vermittelte Block auch in der adulten Gruppe ausgeprägter als in der juvenilen Gruppe ($p < 0,01$) (Hardt et al., 2021, Fig. 2E-G).

Molekularbiologische Untersuchungen zur Expression von TARP/CNIH-2

Meine Experimente zeigten bis hierhin, dass sowohl CP- und als auch CI-AMPA_R-Komplexe in hippokampalen NG2-Gliazellen vorliegen. Ich konnte insgesamt annehmen, dass die Ca^{2+} -Permeabilität glialer AMPAR im Zuge der Entwicklung von p10 zu p60 zunimmt. Es ergab sich jedoch eine Diskrepanz zwischen kaum vorhandenem intrazellulärem spannungsabhängigem Polyamin-Block sowie geringer Effektivität der extrazellulären Nasp_m-Applikation einerseits und andererseits einem stärkeren Effekt der intrazellulären Nasp_m-Applikation. AMPAR-Hilfsproteine, insbesondere TARP, verringern die Effektivität des intrazellulären Polyamin-Blocks sehr stark und auch die Wirksamkeit

von Agonisten und Antagonisten wird durch TARP reguliert (Jackson und Nicoll, 2011; Kott et al., 2009; Soto et al., 2014). Ich analysierte daher als Nächstes die Expression von AMPAR-Hilfsproteinen auf Transkript-Ebene in vorher elektrophysiologisch charakterisierten Zellen. Hierzu sammelte ich hippokampale NG2-Gliazellen nach optischer und elektrophysiologischer Identifikation wie oben beschrieben. Dann erfolgte eine Einzelzell-Multiplex-RT-PCR.

In allen gesammelten Zellen wird der für NG2-Gliazellen spezifische Marker PDGFR α -mRNA exprimiert (juvenil: n = 64; adult: n = 43) (Hardt et al., 2021, Fig.3A-C). Die AMPAR-Hilfsuntereinheiten werden unterschiedlich häufig exprimiert. In juvenilen Mäusen exprimieren die meisten Zellen TARP γ 4 (80 %, n = 43), TARP γ 7 (100 %, n = 24), TARP γ 8 (67 %, n = 43) und CNIH-2 (100 %, n = 19). In adulten Mäusen zeigt sich ein ähnliches Expressionsmuster: TARP γ 4 (95 %, n = 21), TARP γ 7 (86 %, n = 20) und CNIH-2 (71 %, n = 20) werden am häufigsten exprimiert. Die Expressionsfrequenz von TARP γ 8 nimmt jedoch signifikant ab auf noch 23 % (n = 21, p < 0,001). Auch CNIH-2 wird weniger häufig exprimiert (72 %, n = 20, p = 0,02) (Hardt et al., 2021, Fig.3A-C).

Die Einzelzell-PCR erlaubt eine Aussage darüber, ob ein Gen in einer Zelle exprimiert wird oder nicht (ja/nein). Um auch eine quantitative Aussage zur Expressionsstärke treffen zu können, isolierte ich NG2-Gliazellen aus Hippokampi der NG2ki-EYFP-Mauslinie in beiden Altersstufen mittels FACS. Danach untersuchte ich die mRNA-Expression dieser Gene mittels einer quantitativen RT-Echtzeit-PCR.

In juvenilen Mäusen (N = 8) wird TARP γ 4 am meisten exprimiert (Verhältnis der Expression zu b-Aktin $0,864 \pm 0,166$), gefolgt von γ 7 ($0,064 \pm 0,014$) und CNIH-2 ($0,05 \pm 0,011$). Die Expression von γ 8 ist gering in NG2-Gliazellen ($0,014 \pm 0,004$). TARP γ 2 und γ 5 liegen an der Nachweisgrenze. TARP γ 3 wird nicht exprimiert. In NG2-Gliazellen älterer Mäuse (N = 12) sind die relativen Expressionsniveaus der Transkripte der AMPAR-Hilfsproteine insgesamt geringer, aber die Rangfolge der einzelnen TARP entspricht dem der Zellen jüngerer Mäuse (TARP γ 4, $0,570 \pm 0,313$; TARP γ 7, $0,040 \pm 0,021$; CNIH-2, $0,018 \pm 0,008$; TARP γ 8, $0,008 \pm 0,003$) (Hardt et al., 2021, Fig. 3D).

Pharmakologische Untersuchung der Soma-nahen AMPAR-Ströme an isolierten Zellen

Da in akuten Schnitten die Applikation von Rezeptor-Agonisten/-Antagonisten durch die Badlösung langsam ist und Diffusionsbarrieren sowie indirekte pharmakologische Effekte im Gehirnschnitt nicht ausgeschlossen werden können, wurden die Eigenschaften der AMPAR ergänzend auch in akut isolierten Zellen untersucht. Mit Spermin (50 μM) in der intrazellulären Lösung können an isolierten Zellen nach Kainat-Applikation (250 μM in Anwesenheit von CTZ (100 μM) als AMPAR-Modulator) Einwärtsströme beim Haltepotenzial von -70 mV hervorgerufen werden (beide Altersstufen p10 und p60; Hardt et al., 2021, Fig. 4B, D, Fig. 5B, D). In jungen Mäusen ist die Strom-Spannungskurve auswärtsgerichtet (RI = $1,26 \pm 0,27$, n = 35, N = 13, Fig. 4C), in älteren Mäusen hingegen annähernd linear (RI = $0,98 \pm 0,26$, n = 20, N = 10, Hardt et al., 2021, Fig. 5C, $p < 0,001$).

Obwohl der Spermin-Block auch in isolierten Zellen nur schwach ausgeprägt ist, deutet der Unterschied des Verlaufs der Strom-Spannungskurven der AMPAR-Ströme auch auf eine höhere Ca^{2+} -Permeabilität in NG2-Gliazellen älterer Mäuse hin. Durch Inkubation in 50 μM Naspin können die Einwärtsströme (U = -70 mV) in der juvenilen Gruppe um $53,1 \pm 18,3\%$ (n = 15, N = 11; Hardt et al., 2021, Fig. 4B, C), aber in der adulten Gruppe noch deutlich stärker blockiert werden ($77,4 \pm 15,2\%$, n = 10, N = 6, $p = 0,002$; Hardt et al., 2021, Fig. 5B, C). Zur Überprüfung dieser Befunde diente der Antagonist IEM-1460, der ebenfalls CP-AMPA inhiert (Magazanik et al., 1997). IEM-1460 (100 μM) inhiert $38,8 \pm 10,8\%$ der Kainat-evozierten Ströme in der juvenilen Gruppe (n = 11, N = 4; Hardt et al., 2021, Fig. 4D) und zeigt analog zu Naspin eine größere Effektivität in der adulten Gruppe ($63,1 \pm 6,4\%$, n = 6, N = 3, $p < 0,001$; Hardt et al., 2021, Fig. 5D). Sowohl die IEM-1460-sensitiven als auch Naspin-sensitiven Ströme sind einwärtsgerichtet. Das weist darauf hin, dass sie tatsächlich durch CP-AMPA vermittelt werden. Ergänzende Experimente mit Na^+ -freier Lösung bestätigen das Vorliegen von CP-AMPA, können jedoch im Gegensatz zu den vorhergehenden Untersuchungen keine altersabhängige Modulation feststellen (Hardt et al., 2021, Fig. 6A-D).

Aufgrund der nachgewiesenen entwicklungsabhängigen Expression von TARP $\gamma 8$ wurde auch der Effekt des selektiven TARP- $\gamma 8$ -AMPA-Antagonisten JNJ5511118 (Gardinier et al., 2016; Maher et al., 2016) untersucht. Überraschenderweise reduziert JNJ5511118 (10 μM) die Kainat-evozierten Ströme mit $50,5 \pm 20,0\%$ effektiver in der adulten Gruppe

(n = 6, N = 3; Hardt et al., 2021, Fig. 5B, D) als in der juvenilen ($30,5 \pm 6,9\%$, n = 8, N = 5; Hardt et al., 2021, Fig. 4B, D). Die Expression von TARP $\gamma 8$ wird jedoch während der postnatalen Entwicklung in NG2-Gliazellen gegensätzlich reguliert (Hardt et al., 2021, Fig. 3C, D). Im Gegensatz zu den Nasp- oder IEM-1460-sensitiven Strömen sind die Strom-Spannungskurven der JNJ55511118-sensitiven Ströme auswärtsgerichtet. Dies legt eine Assoziation von TARP $\gamma 8$ mit CI-AMPA nahe. Um der Frage weiter nachzugehen, wurde die Applikation von JNJ55511118 mit der nachfolgenden oder vorausgehenden Applikation der Polyamine-Analoga kombiniert. Zusammenfassend zeigt sich eine additive, aber nicht vollständige Inhibition der AMPA-Ströme. Durch Wechsel der Abfolge der Antagonisten wird ersichtlich, dass die Fraktionen der Nasp- und IEM-1460-sensitiven Ströme nur eine geringe Überlappung mit den JNJ55511118-sensitiven Strömen zeigen (Hardt et al., 2021, Fig. 4F, G). Es bestätigt sich also, dass TARP $\gamma 8$ vorrangig mit CI-AMPA assoziiert ist.

Pharmakologische Untersuchung der postsynaptischen AMPA-Ströme in situ

Die meisten AMPA werden in postsynaptischen Verankerungsstellen gefunden, die sich auf den feinen Zell-Fortsätzen befinden (Haberlandt et al., 2011). Bei der akuten Isolierung von Zellen gehen viele dieser feinen Fortsätze unweigerlich verloren; Experimente an akut isolierten Zellen erlauben daher eine Aussage über die Rezeptoreigenschaften in der Nähe des Somas. Um auch die postsynaptischen Rezeptoren in den Fortsätzen beurteilen zu können, erfolgten ergänzend Stimulationsexperimente in akuten hippocampalen Schnitten. Nasp (50 μM) und IEM-1460 (100 μM) führen zu deutlichen Amplitudenminderungen der synaptischen Ströme in Gliazellen. Die Effektivität der Inhibition unterscheidet sich nicht in den beiden Altersgruppen. Nach minimaler Stimulation bei einer Frequenz von 0,1 Hz inhibieren beide Substanzen die evozierten postsynaptischen Ströme (Hardt et al., 2021, Fig. 7 A-D).

1.5 Diskussion

Expression von TARP und CNIH in hippocampalen NG2-Gliazellen

Meine molekularen Untersuchungen zeigen, dass hippocampale NG2-Gliazellen die Hilfsproteine TARP $\gamma 4$, $\gamma 7$, $\gamma 8$ und CNIH-2 exprimieren. TARP $\gamma 4$ ist das prädominante

Hilfsprotein in beiden untersuchten Altersgruppen, gefolgt von $\gamma 7$, $\gamma 8$ und CNIH-2. Die Expression der Hilfsproteine nimmt dabei im Lauf der Entwicklung – von juvenil (p10) bis adult (p60) – ab. Diese entwicklungsabhängige Modulation beobachte ich sowohl in Einzelzellanalysen (geringere Expressionsfrequenz) als auch auf Populationsebene durch Untersuchung FAC-sortierter NG2-Gliazellen (geringere relative Expression im Vergleich zum Referenzgen ACTB). Der von mir festgestellte Befund einer prädominanten Expression von TARP $\gamma 4$ und $\gamma 7$ korreliert mit RNA-Sequenzierungsanalysen, die Larson et al. (2016) in kortikalen NG2-Gliazellen im Alter von p17 durchgeführt haben. Auch in NG2-Gliazellen des Vorderhirns kann die Transkription von $\gamma 4$, $\gamma 5$ und $\gamma 8$ nachgewiesen werden (Cahoy et al., 2008). Im Gegensatz hierzu zeigen Zonouzi et al. (2011), dass NG2-Gliazellen im N. opticus $\gamma 2$, $\gamma 3$ und $\gamma 5$, nicht jedoch $\gamma 7$ und $\gamma 8$ exprimieren. Diese unterschiedlichen Expressionsprofile erklären sich dadurch, dass NG2-Gliazellen eine sowohl regionale als auch entwicklungsabhängige Heterogenität aufweisen, die sich u. a. in der globalen Transkript- und Protein-Expression widerspiegelt (Moshrefi-Ravasdjani et al., 2017). Neurogliale Synapsen machen in den ersten Lebensmonaten einen Reifeprozess durch (Mangin et al., 2008). In älteren Mäusen nimmt die neurogliale synaptische Konnektivität bei gleichbleibender Dichte von AMPAR ab (Passlick et al., 2016). Diese Erkenntnisse korrelieren mit der von mir beobachteten Abnahme von TARP und CNIH-2 während der Entwicklung.

TARP/CNIH kontrollieren die Funktion und subzelluläre Verteilung von AMPAR

TARP $\gamma 4$ wird charakteristischerweise in der embryonalen und frühen postnatalen Entwicklung exprimiert und vorwiegend in zerebellären, hippokampalen, neokortikalen Gliazellen gefunden (Tomita et al., 2003; Fukaya et al., 2005). Der Nachweis in hippokampalen NG2-Gliazellen stützt die These einer Zelltyp-Spezifität von TARP $\gamma 4$. Die Ko-Expression von TARP $\gamma 4$ mit GluA2 bewirkt eine verlangsamte und oftmals unvollständige Desensitivierung, während die Rektifizierung der Strom-Spannungskurve nicht verändert wird (Korber et al., 2007). NG2-Gliazellen weisen in der frühen postnatalen Entwicklung signifikante altersabhängige Unterschiede in der Spleißvariantenexpression auf (Seifert et al., 2003). Die Kinetik der Desensitivierung ändert sich aber kaum (Seifert et al. 1997b, Seifert et al., 2003). Der von mir erhobene Befund einer prädominanten Expression von TARP $\gamma 4$ mit GluA2 könnte erklären, warum die in der Entwicklung zunehmende

Expression der GluA2-Flip-Variante in NG2-Gliazellen nicht mit einer verlangsamten Rezeptor-Desensitivierung einhergeht.

TARP $\gamma 7$ wird vorwiegend in zerebellären Purkinje- und Körnerzellen exprimiert (Kato et al., 2007). Obgleich TARP $\gamma 7$ den Stargazer-Phänotyp nicht kuriert, beeinflusst es die biophysikalischen AMPAR-Eigenschaften auf ähnliche Weise wie andere TARP, indem es u. a. die Rezeptor-Deaktivierung und -Desensitivierung verlangsamt (Kato et al., 2007). Diese Modulation ist aber auf GluA1- und GluA2-enthaltende AMPAR beschränkt (Kato et al. 2008). Studniarczyk et al. (2013) zeigen, dass TARP $\gamma 7$ in Körnerzellen selektiv das Vorkommen von CP-AMPAR fördert und das von CI-AMPAR supprimiert. Da die von mir nachgewiesene Expression von TARP $\gamma 7$ auch in hippocampalen NG2-Gliazellen mit dem Vorkommen CP-AMPAR in beiden untersuchten Altersgruppen korreliert, liegt es nahe, dass TARP $\gamma 7$ in NG2-Gliazellen eine ähnliche Funktion hat.

Meine Untersuchungen zeigen, dass in hippocampalen NG2-Gliazellen das Expressionsniveau von TARP $\gamma 8$ unter dem von $\gamma 4$ und $\gamma 7$ liegt und noch im Rahmen der Entwicklung stark herunterreguliert wird. TARP $\gamma 8$ wird vorwiegend im Hippokampus exprimiert (Tomita et al., 2003). Die Deletion von TARP $\gamma 8$ verhindert LTP, da es die basale AMPAR-Expression und die synaptische und extrasynaptische Lokalisierung reguliert (Rouach et al., 2005; Fukaya et al., 2006). Sowohl TARP $\gamma 7$ als auch $\gamma 8$ verstärken die Potenzierung durch CTZ und die Kainat-Effektivität (Gill et al., 2011). Meine Arbeit dokumentiert, dass in hippocampalen NG2-Gliazellen TARP $\gamma 8$ vorwiegend mit CI-AMPAR assoziiert ist.

Die gliale Expression von CNIH-2 wird in hippocampalen Astrozyten und in OPC des Nervus opticus beschrieben (Schwenk et al., 2009; Coombs et al., 2012). Ich habe CNIH-2 auch in der großen Mehrzahl der hippocampalen NG2-Gliazellen nachgewiesen. In heterologen Expressionssystemen vermitteln TARP $\gamma 4$, $\gamma 7$ und $\gamma 8$ eine Erholung von der Desensitivierung. Dieser Prozess wird auch als Re-Sensitivierung bezeichnet und durch die Expression von CNIH-2 aufgehoben (Kato et al., 2010). In hippocampalen NG2-Gliazellen wird dieses Phänomen nicht beobachtet (Seifert und Steinhäuser, 1995; Seifert et al., 1997b). Die in meiner Arbeit nachgewiesene Expression von CNIH-2 könnte diesen Befund gut erklären. In hippocampalen NG2-Gliazellen wird TARP $\gamma 8$ während der Entwicklung herunterreguliert, was sich in seiner geringeren Inzidenz sowohl in den Einzelzellanalysen als auch auf globaler Zelltypebene zeigt. Unerwarteterweise ist jedoch

die durch JNJ verursachte Modulation in NG2-Gliazellen älterer Mäuse ausgeprägter als die in jüngeren Mäusen. Auch dieser Unterschied könnte durch die Interaktion mit verschiedenen TARP und CNIH-2 erklärt werden (Schober et al., 2011).

Ca²⁺-Permeabilität glialer AMPA-Rezeptoren

Alle von mir untersuchten hippocampalen NG2-Gliazellen in der NG2-EYFP-Mauslinie weisen das von Steinhäuser et al. (1994) beschriebene „komplexe“ elektrophysiologische Strommuster auf. Der von mir in NG2-Gliazellen adulter Mäuse festgestellte geringere Eingangswiderstand bestätigt frühere Ergebnisse und korreliert mit der erhöhten K_{IR4.1}-Expression und Ruhe-K⁺-Leitfähigkeit in diesem Alter (Kressin et al., 1995; Moshrefi-Ravasdjani et al., 2017; Passlick et al., 2016; Seifert und Steinhäuser, 2018). Meine funktionellen Untersuchungen mittels der Applikation von Polyaminen im akuten hippocampalen Schnitt bestätigen auch das Vorhandensein von CP-AMPA in NG2-Gliazellen der untersuchten Altersgruppen. Sie legen eine Zunahme der Ca²⁺-Permeabilität der AMPAR in NG2-Gliazellen adulter Mäuse nahe. Die Strom-Spannungskurven mit Spermin in der Pipette sind insgesamt auswärtsgerichtet, was auf geringe Ca²⁺-Permeabilität hindeutet. In der Tat ist die stärker ausgeprägte Auswärtsrektifizierung in Zellen juveniler Mäuse ein erster Hinweis auf eine geringere Ca²⁺-Permeabilität im Vergleich zu Zellen adulter Mäuse. Wie aber die Strom-Spannungskurven der AMPAR in Gliazellen in situ und nach akuter Isolierung zeigen, wird der intrazelluläre Spermin-Block massiv durch die AMPAR-Hilfsproteine TARP und CNIH inhibiert (Coombs et al., 2012; Jackson und Nicoll, 2011, Soto et al., 2014).

Die extrazelluläre Applikation des selektiven CP-AMPA-Inhibitors Naspam via Badlösung in situ führt zu einer moderaten Inhibition der AMPAR-Ströme, offenbart dabei aber keinen signifikanten Unterschied zwischen den Altersgruppen. Die Expression von TARP und CNIH-2 kann jedoch sowohl den intrazellulären Polyamin-Block als auch die Effektivität von Agonisten/Antagonisten wie Naspam vermindern. So wird eine Ca²⁺-Impermeabilität nur vorgetäuscht (Bats et al., 2012; Coombs et al., 2012; Jackson und Nicoll, 2011; Kott et al., 2009; Soto et al., 2014). Die Maskierung des intrazellulären Polyamin-Blocks wird auch in heterologen Expressionssystemen und in Kulturen kortikaler Gliazellen demonstriert (Bowie, 2012; Meucci und Miller, 1998). Die in diesen Experimenten nachgewiesene

Auswärtsrektifizierung als Zeichen eines mangelnden Polyamin-Blocks kann auch aus diesem Grund nicht mit einer fehlenden Ca^{2+} -Permeabilität gleichgesetzt werden.

Die pharmakologische Untersuchung von AMPAR-Eigenschaften an akut isolierten Zellen und die Auslösung von EPSC im akuten Schnitt bestätigen das Vorhandensein von CP-AMPAR sowohl in Nähe des Somas als auch in der Postsynapse. Durch Applikation der CP-AMPAR-spezifischen Blocker Naspn und IEM-1460 kann die Fraktion der CP-AMPAR pharmakologisch isoliert werden. Coombs et al. (2021) zeigen, dass durch die intrazelluläre Applikation von Naspn CP-AMPAR vollständig inhibiert werden. Dieser Block scheint im Gegensatz zum intrazellulären Spermin-Block unabhängig von der TARP-Expression zu sein. Tatsächlich beobachte ich mit Naspn in der intrazellulären Lösung sowohl in der juvenilen als auch in der adulten Gruppe eine ausgeprägtere Rektifizierung der Kainat-evozierten Ströme; dieser Effekt ist überdies in der adulten Gruppe auch ausgeprägter. Der geringere Effekt der extrazellulären Applikation könnte hingegen durch Diffusionsbarrieren im akuten Schnitt bedingt sein. Der von mir festgestellte ausgeprägtere Effekt der intrazellulären im Vergleich zur extrazellulären Applikation von Naspn ist indirekt ein stützendes Indiz für das Vorhandensein von TARP/CNIH-2 in hippokampalen NG2-Gliazellen.

Welche Relevanz hat die Expression von CP-AMPAR in NG2-Gliazellen? Meine Daten weisen darauf hin, dass CI-AMPAR und CP-AMPAR sowohl am Soma als auch an den Fortsätzen lokalisiert sind. Der Ca^{2+} -Einstrom durch die somatischen AMPAR reguliert die Proliferation, Migration und Differenzierung von OPC in der weißen Substanz und ist damit bedeutend für die Myelinisierung (Barron und Kim, 2019; Chen et al., 2018; Kougioumtzidou et al., 2017; Zonouzi et al., 2011). Die Ca^{2+} -Permeabilität der AMPAR ist zudem eine Voraussetzung für die Plastizität der neuroglialen Synapse (Ge et al., 2006). Übermäßiger Ca^{2+} -Einstrom hingegen vermittelt Exzitotoxizität (Barron und Kim, 2019; Carriedo et al., 1998). Bemerkenswerterweise zeigen kürzlich erschienene Arbeiten, dass in besonders aggressiven Hirntumoren wie Glioblastomen Glia-ähnliche Tumorzellen glutamaterge Ca^{2+} -permeable AMPAR-Synapsen mit Nervenzellen ausbilden (Venkataramani und Winkler, 2022). Die hierdurch vermittelte neuronale Stimulation des Krebszellnetzwerks fördert die Invasion und Proliferation von Tumorzellen und damit die Tumorprogression. Perampanel ist ein für die Behandlung von Epilepsien zugelassener

AMPA-Inhibitor (Chappell et al., 2002; French et al., 2012). Es zeigt bei Hirntumor-PatientInnen eine gute antikonvulsive Wirksamkeit und wird derzeit in mehreren Studien zur Rezidiv-Therapie des Glioblastoms getestet (Coppola et al., 2020; Venkataramani und Winkler, 2022). Die Entwicklung TARP-spezifischer Antagonisten wie JNJ-5551111 weckt die Hoffnung auf die Entwicklung von Therapeutika, die noch zielgenauer als die bisher zugelassenen wirken (Kato et al., 2016). Die genaue Kenntnis der Eigenschaften der neuroglialen Synapse könnte dabei nicht zuletzt die Grundlage für die Entwicklung neuartiger Therapieansätze legen.

1.6 Zusammenfassung

NG2-Gliazellen weisen funktionelle postsynaptische AMPAR auf und gehen direkte synaptische Verbindungen mit Nervenzellen ein. Die funktionelle Relevanz der neuroglialen Synapse in der grauen Substanz ist dabei weiterhin unklar. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass hippocampale NG2-Gliazellen die TARP-Untereinheiten $\gamma 4$, $\gamma 7$ und $\gamma 8$ sowie CNIH-2 exprimieren. Die Expression wird insgesamt im Lauf der postnatalen Entwicklung herabreguliert. Das ist insbesondere für TARP $\gamma 8$ und CNIH-2 der Fall. Mittels pharmakologischer Untersuchungen und dem Block einwärtsrektifizierender Rezeptorströme nach Applikation CP-AMPA-spezifischer Inhibitoren habe ich die Ca^{2+} -Permeabilität der AMPAR untersucht und ein Mosaik von CP- und CI-AMPA in hippocampalen NG2-Gliazellen nachgewiesen. CP- und CI-AMPA sind sowohl am Soma als auch in den Fortsätzen lokalisiert. Die Ca^{2+} -Permeabilität der AMPAR nimmt während der Entwicklung zu. Im heterologen Expressionssystem konnte unlängst mittels Elektronenmikroskopie die Struktur von AMPAR und Hilfsproteinen aufgeklärt werden, wie sie auch in Pyramidenzellen des Hippokampus vorkommen. Diese Zellen exprimieren CI-AMPA. Dabei sind AMPAR-Tetramere von zwei GluA1 und zwei GluA2-Untereinheiten mit zwei TARP- $\gamma 8$ - und zwei CNIH-2-Untereinheiten assoziiert (Zhang et al., 2021). In NG2-Gliazellen enthalten CP-AMPA GluA3- und GluA4-Untereinheiten und sind möglicherweise mit TARP $\gamma 7$ und CNIH-2 assoziiert. CI-AMPA hingegen enthalten GluA2 und scheinen sowohl mit TARP $\gamma 4$ und $\gamma 8$ als auch mit CNIH-2 Rezeptorkomplexe zu bilden.

1.7 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Barron T, Kim JH. Neuronal input triggers Ca^{2+} influx through AMPA receptors and voltage-gated Ca^{2+} channels in oligodendrocytes. *Glia* 2019; 67: 1922–1932

Bats C, Soto D, Studniarczyk D, Farrant M, Cull-Candy SG. Channel properties reveal differential expression of TARPed and TARPless AMPARs in stargazer neurons. *Nat Neurosci* 2012; 15: 853–861

Ben-Yaacov A, Gillor M, Haham T, Parsai A, Qneibi M, Stern-Bach Y. Molecular Mechanism of AMPA Receptor Modulation by TARP/Stargazin. *Neuron* 2017; 93: 1126-1137

Bergles DE, Roberts JDB, Somogyi P, Jahr CE. Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature* 2000; 405: 187–191

Bissen D, Foss F, Acker-Palmer A. AMPA receptors and their minions: auxiliary proteins in AMPA receptor trafficking. *Cell Mol Life Sci* 2019; 76: 2133–2169

Bowie D. Redefining the classification of AMPA-selective ionotropic glutamate receptors: Counting the number of AMPA receptor subtypes. *J Physiol* 2012; 590: 49–61

Bowie D, Mayer ML. Inward rectification of both AMPA and kainate subtype glutamate receptors generated by polyamine-mediated ion channel block. *Neuron* 1995; 15: 453–462

Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, Christopherson KS, Xing Y, Lubischer JL, Krieg PA, Krupenko SA, Thompson WJ, Barres BA. A Transcriptome Database for Astrocytes, Neurons, and Oligodendrocytes: A New Resource for Understanding Brain Development and Function. *J Neurosci* 2008; 28: 264–278

Carriedo SG, Yin HZ, Sensi SL, Weiss JH. Rapid Ca^{2+} Entry through Ca^{2+} -Permeable AMPA/Kainate Channels Triggers Marked Intracellular Ca^{2+} Rises and Consequent Oxygen Radical Production. *J Neurosci* 1998; 18: 7727–7738

Chappell AS, Sander JW, Brodie MJ, Chadwick D, Lledo A, Zhang D, Bjerke J, Kiesler GM, Arroyo S. A crossover, add-on trial of talampanel in patients with refractory partial seizures. *Neurology* 2002; 58: 1680–1682

Chen L, Chetkovich DM, Petralia RS, Sweeney NT, Kawasaki Y, Wenthold RJ, Brecht DS, Nicoll RA. Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature* 2000; 408: 936–943

Chen T-J, Kula B, Nagy B, Barzan R, Gall A, Ehrlich I, Kukley M. In Vivo Regulation of Oligodendrocyte Precursor Cell Proliferation Differentiation by the AMPA-Receptor Subunit GluA2. *Cell Rep* 2018; 25: 852-861

Coombs ID, Soto D, Zonouzi M, Renzi M, Shelley C, Farrant M, Cull-Candy SG. Cornichons Modify Channel Properties of Recombinant and Glial AMPA Receptors. *J Neurosci* 2012; 32: 9796–9804

Coombs ID, Bats C, Sexton CA, Cull-Candy SG, Farrant M. Intracellular NASPM allows an unambiguous functional measure of GluA2-lacking calcium-permeable AMPA receptor prevalence. *bioRxiv* 2021: 431828

Coppola A, Zarabla A, Maialetti A, Villani V, Koudriavtseva T, Russo E, Nozzolillo A, Sueri C, Belcastro V, Balestrini S, Ferlazzo E, Giannarelli D, Bilo L, Maschio M. Perampanel Confirms to Be Effective and Well-Tolerated as an Add-On Treatment in Patients With Brain Tumor-Related Epilepsy (PERADET Study). *Front Neurol* 2020; 11: 592

Dimou L, Simon C, Kirchhoff F, Takebayashi H, Gotz M. Progeny of Olig2-Expressing Progenitors in the Gray and White Matter of the Adult Mouse Cerebral Cortex. *J Neurosci* 2008; 28: 10434–10442

Donevan SD, Rogawski MA. Intracellular polyamines mediate inward rectification of Ca²⁺-permeable α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 9298-9302

French JA, Krauss GL, Biton V, Squillacote D, Yang H, Laurenza A, Kumar D, Rogawski MA. Adjunctive perampanel for refractory partial-onset seizures: Randomized phase III study 304. *Neurology* 2012; 79: 589–596

Fukaya M, Tsujita M, Yamazaki M, Kushiya E, Abe M, Akashi K, Natsume R, Kano M, Kamiya H, Watanabe M, Sakimura K. Abundant distribution of TARP γ -8 in synaptic and extrasynaptic surface of hippocampal neurons and its major role in AMPA receptor expression on spines and dendrites. *Eur J Neurosci* 2006; 24: 2177–2190

Fukaya M, Yamazaki M, Sakimura K, Watanabe M. Spatial diversity in gene expression for VDCC γ subunit family in developing and adult mouse brains. *Neurosci Res* 2005; 53: 376–383

Gardinier KM, Gernert DL, Porter WJ, Reel JK, Ornstein PL, Spinazze P, Stevens FC, Hahn P, Hollinshead SP, Mayhugh D, Schkeryantz J, Khilevich A, De Frutos O, Gleason SD, Kato AS, Luffer-Atlas D, Desai PV, Swanson S, Burris KD, Ding C, Heinz BA, Need AB, Barth VN, Stephenson GA, Diseroad BA, Woods TA, Yu H, Brecht D, Witkin JM. Discovery of the First α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid (AMPA) Receptor Antagonist Dependent upon Transmembrane AMPA Receptor Regulatory Protein (TARP) γ -8. *J Med Chem* 2016; 59: 4753–4768

Ge W-P. Long-Term Potentiation of Neuron-Glia Synapses Mediated by Ca^{2+} -Permeable AMPA Receptors. *Science* 2006; 312: 1533–1537

Gill MB, Kato AS, Roberts MF, Yu H, Wang H, Tomita S, Brecht DS. Cornichon-2 Modulates AMPA Receptor-Transmembrane AMPA Receptor Regulatory Protein Assembly to Dictate Gating and Pharmacology. *J Neurosci* 2011; 31: 6928–6938

Gill MB, Kato AS, Wang H, Brecht DS. AMPA receptor modulation by cornichon-2 dictated by transmembrane AMPA receptor regulatory protein isoform: CNIH-2 differentially modulates TARP isoforms. *Eur J Neurosci* 2012; 35: 182–194

Haberlandt C, Derouiche A, Wyczynski A, Haseleu J, Pohle J, Karram K, Trotter J, Seifert G, Frotscher M, Steinhäuser C, Jabs R. Gray Matter NG2 Cells Display Multiple Ca^{2+} -Signaling Pathways and Highly Motile Processes. *PLoS ONE* 2011; 6: e17575

Hansen KB, Wollmuth LP, Bowie D, Furukawa H, Menniti FS, Sobolevsky AI, Swanson GT, Swanger SA, Greger IH, Nakagawa T, McBain CJ, Jayaraman V, Low C-M, Dell'Acqua ML, Diamond JS, Camp CR, Perszyk RE, Yuan H, Traynelis SF. Structure, Function, and Pharmacology of Glutamate Receptor Ion Channels. *Pharmacol Rev* 2021; 73: 1469–1658. Copyright American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics

Hardt S, Tascio D, Passlick S, Timmermann A, Jabs R, Steinhäuser C, Seifert G. Auxiliary Subunits Control Function and Subcellular Distribution of AMPA Receptor Complexes in NG2 Glia of the Developing Hippocampus. *Front Cell Neurosci* 2021; 15: 669717

Hashimoto K, Fukaya M, Qiao X, Sakimura K, Watanabe M, Kano M. Impairment of AMPA Receptor Function in Cerebellar Granule Cells of Ataxic Mutant Mouse Stargazer. *J Neurosci* 1999; 19: 6027–6036

Jabs R, Kirchhoff F, Kettenmann H, Steinhäuser C. Kainate activates Ca^{2+} -permeable glutamate receptors and blocks voltage-gated K^+ currents in glial cells of mouse hippocampal slices. *Pflügers Arch* 1994; 426: 310–319

Jabs R, Pivneva T, Hüttmann K, Wyczynski A, Nolte C, Kettenmann H, Steinhäuser C. Synaptic transmission onto hippocampal glial cells with hGFAP promoter activity. *J Cell Sci* 2005; 118: 3791–3803

Jackson AC, Nicoll RA. The Expanding Social Network of Ionotropic Glutamate Receptors: TARPs and Other Transmembrane Auxiliary Subunits. *Neuron* 2011; 70: 178–199. Copyright Elsevier

Jackson AC, Milstein AD, Soto D, Farrant M, Cull-Candy SG, Nicoll RA. Probing TARP Modulation of AMPA Receptor Conductance with Polyamine Toxins. *J Neurosci* 2011; 31: 7511–7520

Kamboj SK, Swanson GT, Cull-Candy SG. Intracellular spermine confers rectification on rat calcium-permeable AMPA and kainate receptors. *J Physiol* 1995; 486: 297–303

Karram K, Goebbels S, Schwab M, Jennissen K, Seifert G, Steinhäuser C, Nave K-A, Trotter J. NG2-expressing cells in the nervous system revealed by the NG2-EYFP-knockin mouse. *Genesis* 2008; 46: 743–757

Kato AS, Burris KD, Gardinier KM, Gernert DL, Porter WJ, Reel J, Ding C, Tu Y, Schober DA, Lee MR, Heinz BA, Fitch TE, Gleason SD, Catlow JT, Yu H, Fitzjohn SM, Pasqui F, Wang H, Qian Y, Sher E, Zwart R, Wafford KA, Rasmussen K, Ornstein PL, Isaac JTR, Nisenbaum ES, Brecht DS, Witkin JM. Forebrain-selective AMPA-receptor antagonism guided by TARP γ -8 as an antiepileptic mechanism. *Nat Med* 2016; 22: 1496–1501

Kato AS, Gill MB, Ho MT, Yu H, Tu Y, Siuda ER, Wang H, Qian Y-W, Nisenbaum ES, Tomita S, Brecht DS. Hippocampal AMPA Receptor Gating Controlled by Both TARP and Cornichon Proteins. *Neuron* 2010; 68: 1082–1096

Kato AS, Siuda ER, Nisenbaum ES, Brecht DS. AMPA receptor subunit-specific regulation by a distinct family of type II TARPs. *Neuron* 2008; 59: 986–996

Kato AS, Zhou W, Milstein AD, Knierman MD, Siuda ER, Dotzlaw JE, Yu H, Hale JE, Nisenbaum ES, Nicoll RA, Brecht DS. New Transmembrane AMPA Receptor Regulatory Protein Isoform, γ -7, Differentially Regulates AMPA Receptors. *J Neurosci* 2007; 27: 4969–4977

Koh DS, Burnashev N, Jonas P. Block of native Ca^{2+} -permeable AMPA receptors in rat brain by intracellular polyamines generates double rectification. *J Physiol* 1995; 486: 305–312

Koike M, Iino M, Ozawa S. Blocking effect of 1-naphthyl acetyl spermine on Ca²⁺-permeable AMPA receptors in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci Res* 1997; 29: 27–36

Korber C, Werner M, Kott S, Ma Z-L, Hollmann M. The Transmembrane AMPA Receptor Regulatory Protein $\gamma 4$ Is a More Effective Modulator of AMPA Receptor Function than Stargazin ($\gamma 2$). *J Neurosci* 2007; 27: 8442–8447

Kott S, Sager C, Tapken D, Werner M, Hollmann M. Comparative analysis of the pharmacology of GluR1 in complex with transmembrane AMPA receptor regulatory proteins $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$, and $\gamma 8$. *Neuroscience* 2009; 158: 78–88

Kougioumtzidou E, Shimizu T, Hamilton NB, Tohyama K, Sprengel R, Monyer H, Attwell D, Richardson WD. Signalling through AMPA receptors on oligodendrocyte precursors promotes myelination by enhancing oligodendrocyte survival. *Elife* 2017; 6: e28080

Kressin K, Kuprijanova E, Jabs R, Seifert G, Steinhäuser C. Developmental regulation of Na⁺ and K⁺ conductances in glial cells of mouse hippocampal brain slices. *Glia* 1995; 15: 173–187

Kukley M, Nishiyama A, Dietrich D. The Fate of Synaptic Input to NG2 Glial Cells: Neurons Specifically Downregulate Transmitter Release onto Differentiating Oligodendroglial Cells. *J Neurosci* 2010; 30: 8320–8331

Larson VA, Zhang Y, Bergles DE. Electrophysiological properties of NG2⁺ cells: Matching physiological studies with gene expression profiles. *Brain Res* 2016; 1638: 138–160

Letts VA, Felix R, Biddlecome GH, Arikath J, Mahaffey CL, Valenzuela A, Bartlett FS, Mori Y, Campbell KP, Frankel WN. The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca²⁺-channel γ subunit. *Nat Genet* 1998; 19: 340–347

Magazanik LG, Buldakova SL, Samoilova MV, Gmiro VE, Mellor IR, Usherwood PNR. Block of open channels of recombinant AMPA receptors and native AMPA/kainate receptors by Adamantane derivatives. *Journal Physiol* 1997; 505: 655–663

Maher MP, Wu N, Ravula S, Ameriks MK, Savall BM, Liu C, Lord B, Wyatt RM, Matta JA, Dugovic C, Yun S, Ver Donck L, Steckler T, Wickenden AD, Carruthers NI, Lovenberg TW. Discovery and Characterization of AMPA Receptor Modulators Selective for TARP- γ 8. *J Pharmacol Exp Ther* 2016; 357: 394–414

Mangin J-M, Kunze A, Chittajallu R, Gallo V. Satellite NG2 Progenitor Cells Share Common Glutamatergic Inputs with Associated Interneurons in the Mouse Dentate Gyrus. *J Neurosci* 2008; 28: 7610–7623

Matthias K, Kirchhoff F, Seifert G, Hüttmann K, Matyash M, Kettenmann H, Steinhäuser C. Segregated Expression of AMPA-Type Glutamate Receptors and Glutamate Transporters Defines Distinct Astrocyte Populations in the Mouse Hippocampus. *J Neurosci* 2003; 23: 1750–1758

Mauric V, Mölders A, Harmel N, Heimrich B, Sergeeva OA, Klöcker N. Ontogeny repeats the phylogenetic recruitment of the cargo exporter cornichon into AMPA receptor signaling complexes. *Mol Cell Neurosci* 2013; 56: 10–17

Mayer ML, Westbrook GL. Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. *J Physiol* 1987; 394: 501–527

Mense S. ZNS – funktionelle Systeme. In: Aumüller G, Aust G, Doll A, Engele J, Kirsch J, Mense S, Reißig D, Salvetter J, Schmidt W, Schmitz F, Schulte E, Spanel-Borowski K, Wolff W, Wurzingler LJ, Zilch H-G, Hrsg. *Anatomie*. Stuttgart: Thieme, 2010: 1142–1146

Meucci O, Miller RJ. Dissociation between the Joro spider toxin sensitivity of recombinant α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors and their ability to increase intracellular calcium. *Neuropharmacology* 1998; 37: 1431–1443

Milstein AD, Zhou W, Karimzadegan S, Brecht DS, Nicoll RA. TARP Subtypes Differentially and Dose-Dependently Control Synaptic AMPA Receptor Gating. *Neuron* 2007; 55: 905–918

Moshrefi-Ravasdjani B, Dublin P, Seifert G, Jennissen K, Steinhäuser C, Kafitz KW, Rose CR. Changes in the proliferative capacity of NG2 cell subpopulations during postnatal development of the mouse hippocampus. *Brain Struct Funct* 2017; 222: 831–847

Passlick S, Trotter J, Seifert G, Steinhäuser C, Jabs R. The NG2 Protein Is Not Required for Glutamatergic Neuron–NG2 Cell Synaptic Signaling. *Cereb Cortex* 2016; 26: 51–57

Rouach N, Byrd K, Petralia RS, Elias GM, Adesnik H, Tomita S, Karimzadegan S, Kealey C, Brecht DS, Nicoll RA. TARP γ -8 controls hippocampal AMPA receptor number, distribution and synaptic plasticity. *Nat Neurosci* 2005; 8: 1525–1533

Schnell E, Sizemore M, Karimzadegan S, Chen L, Brecht DS, Nicoll RA. Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number. *PNAS* 2002; 99: 13902–13907

Schober DA, Gill MB, Yu H, Gernert DL, Jeffries MW, Ornstein PL, Kato AS, Felder CC, Brecht DS. Transmembrane AMPA Receptor Regulatory Proteins and Cornichon-2 Allosterically Regulate AMPA Receptor Antagonists and Potentiators*. *J Biol Chem* 2011; 286: 13134–13142

Schröder W, Seifert G, Hüttmann K, Hinterkeuser S, Steinhäuser C. AMPA Receptor-Mediated Modulation of Inward Rectifier K⁺ Channels in Astrocytes of Mouse Hippocampus. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2002; 19: 447–458

Schwenk J, Harmel N, Zolles G, Bildl W, Kulik A, Heimrich B, Chisaka O, Jonas P, Schulte U, Fakler B, Klöcker N. Functional Proteomics Identify Cornichon Proteins as Auxiliary Subunits of AMPA Receptors. *Science* 2009; 323: 1313–1319

Seifert G, Rehn L, Weber M, Steinhäuser C. AMPA receptor subunits expressed by single astrocytes in the juvenile mouse hippocampus. *Brain Res* 1997a; 47: 286–294

Seifert G, Steinhäuser C. Glial Cells in the Mouse Hippocampus Express AMPA Receptors with an Intermediate Ca^{2+} Permeability. *Eur J Neurosci* 1995; 7: 1872–1881

Seifert G, Steinhäuser C. Heterogeneity and function of hippocampal macroglia. *Cell Tissue Res* 2018; 373: 653–670

Seifert G, Weber M, Schramm J, Steinhäuser C. Changes in splice variant expression and subunit assembly of AMPA receptors during maturation of hippocampal astrocytes. *Mol Cell Neurosci* 2003; 22: 248–258

Seifert G, Zhou M, Steinhäuser C. Analysis of AMPA Receptor Properties During Postnatal Development of Mouse Hippocampal Astrocytes. *J Neurophysiol* 1997b; 78: 2916–2923

Shi Y, Suh YH, Milstein AD, Isozaki K, Schmid SM, Roche KW, Nicoll RA. Functional comparison of the effects of TARPs and cornichons on AMPA receptor trafficking and gating. *PNAS* 2010; 107: 16315–16319

Sobolevsky AI, Rosconi MP, Gouaux E. X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature* 2009; 462: 745–756

Soto D, Coombs ID, Gratacos-Batlle E, Farrant M, Cull-Candy SG. Molecular Mechanisms Contributing to TARP Regulation of Channel Conductance and Polyamine Block of Calcium-Permeable AMPA Receptors. *J Neurosci* 2014; 34: 11673–11683

Soto D, Coombs ID, Kelly L, Farrant M, Cull-Candy SG. Stargazin attenuates intracellular polyamine block of calcium-permeable AMPA receptors. *Nat Neurosci* 2007; 10: 1260–1267

Soto D, Coombs ID, Renzi M, Zonouzi M, Farrant M, Cull-Candy SG. Selective regulation of long-form calcium-permeable AMPA receptors by an atypical TARP, γ -5. *Nat Neurosci* 2009; 12: 277–285

Steinhäuser C, Kressin K, Kuprijanova E, Weber M, Seifert G. Properties of voltage-activated Na^+ and K^+ currents in mouse hippocampal glial cells in situ and after acute isolation from tissue slices. *Pflugers Arch* 1994; 428: 610–620

Steinhäuser C, Dietrich D. Neuron-Glia Synapsen im Gehirn: Eigenschaften, Diversität und Funktionen von NG2 Glia. *eNeuroforum* 2015; 21: 106–111

Studniarczyk D, Coombs I, Cull-Candy SG, Farrant M. TARP γ -7 selectively enhances synaptic expression of calcium-permeable AMPARs. *Nat Neurosci* 2013; 16: 1266–1274

Timmermann A, Tascio D, Jabs R, Boehlen A, Domingos C, Skubal M, Huang W, Kirchhoff F, Henneberger C, Bilkei-Gorzo A, Seifert G, Steinhäuser C. Dysfunction of NG2 glial cells affects neuronal plasticity and behavior. *Glia* 2023; 71: 1481–1501

Tomita S, Adesnik H, Sekiguchi M, Zhang W, Wada K, Howe JR, Nicoll RA, Brecht DS. Stargazin modulates AMPA receptor gating and trafficking by distinct domains. *Nature* 2005; 435: 1052–1058

Tomita S, Chen L, Kawasaki Y, Petralia RS, Wenthold RJ, Nicoll RA, Brecht DS. Functional studies and distribution define a family of transmembrane AMPA receptor regulatory proteins. *J Cell Biol* 2003; 161: 805–816

Tóth K, McBain CJ. Afferent-specific innervation of two distinct AMPA receptor subtypes on single hippocampal interneurons. *Nat Neurosci* 1998; 1: 572–578

Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R. Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacol Rev* 2010; 62: 405–496

Venkataramani V, Winkler F. *Krebsneurowissenschaft. Nervenarzt* 2022; 93: 977–986

Washburn MS, Numberger M, Zhang S, Dingledine R. Differential Dependence on GluR2 Expression of Three Characteristic Features of AMPA Receptors. *J Neurosci* 1997; 17: 9393–9406

Weiss J. Ca^{2+} Permeable AMPA Channels in Diseases of the Nervous System. *Front Mol Neurosci* 2011; 4: 42

Zhou M, Schools GP, Kimelberg HK. Development of GLAST(+) Astrocytes and NG2(+) Glia in Rat Hippocampus CA1: Mature Astrocytes Are Electrophysiologically Passive. *J Neurophysiol* 2006; 95: 134–143

Ziff EB. TARPs and the AMPA Receptor Trafficking Paradox. *Neuron* 2007; 53: 627–633. Copyright Elsevier

Zonouzi M, Renzi M, Farrant M, Cull-Candy SG. Bidirectional plasticity of calcium-permeable AMPA receptors in oligodendrocyte lineage cells. *Nat Neurosci* 2011; 14: 1430–1438

2. Veröffentlichung

Urheberrechtshinweis: © 2021 Stefan Hardt, Dario Tascio, Stefan Passlick, Aline Timmermann, Ronald Jabs, Christian Steinhäuser, Gerald Seifert. Der nachfolgende Artikel stammt aus der Zeitschrift „Frontiers in Cellular Neuroscience (Ausgabe 15)“ (<https://doi.org/10.3389/fncel.2021.669717>). Dieser Artikel ist frei zugänglich und wird unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution (CC-BY) Lizenz veröffentlicht (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). Die Verwendung, Verbreitung oder Vervielfältigung in anderen Foren ist gestattet, sofern die ursprünglichen AutorInnen und die RechteinhaberInnen genannt werden und die Originalpublikation entsprechend der anerkannten wissenschaftlichen Praxis zitiert wird. Es ist keine Nutzung, Verbreitung oder Vervielfältigung gestattet, die nicht diesen Bedingungen entspricht.

Copyright statement: © 2021 Stefan Hardt, Dario Tascio, Stefan Passlick, Aline Timmermann, Ronald Jabs, Christian Steinhäuser, Gerald Seifert. The following article was published in the journal „Frontiers in Cellular Neuroscience (volume 15)“ (<https://doi.org/10.3389/fncel.2021.669717>). This article is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC-BY) License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Auxiliary Subunits Control Function and Subcellular Distribution of AMPA Receptor Complexes in NG2 Glia of the Developing Hippocampus

Stefan Hardt, Dario Tascio, Stefan Passlick, Aline Timmermann, Ronald Jabs, Christian Steinhäuser* and Gerald Seifert*

Institute of Cellular Neurosciences, Medical Faculty, University of Bonn, Bonn, Germany

OPEN ACCESS

Edited by:

Christian Lohr,
University of Hamburg, Germany

Reviewed by:

Arthur Morgan Butt,
University of Portsmouth,
United Kingdom
Yuriy Pankratov,
University of Warwick,
United Kingdom
Jakob von Engelhardt,
Johannes Gutenberg University
Mainz, Germany

*Correspondence:

Christian Steinhäuser
cste@uni-bonn.de
Gerald Seifert
Gerald.Seifert@ukbonn.de

Specialty section:

This article was submitted to
Non-Neuronal Cells,
a section of the journal
Frontiers in Cellular Neuroscience

Received: 19 February 2021

Accepted: 18 May 2021

Published: 10 June 2021

Citation:

Hardt S, Tascio D, Passlick S,
Timmermann A, Jabs R,
Steinhäuser C and Seifert G (2021)
Auxiliary Subunits Control Function
and Subcellular Distribution of AMPA
Receptor Complexes in NG2 Glia
of the Developing Hippocampus.
Front. Cell. Neurosci. 15:669717.
doi: 10.3389/fncel.2021.669717

Synaptic and axonal glutamatergic signaling to NG2 glia in white matter is critical for the cells' differentiation and activity dependent myelination. However, in gray matter the impact of neuron-to-NG2 glia signaling is still elusive, because most of these cells keep their non-myelinating phenotype throughout life. Early in postnatal development, hippocampal NG2 glia express AMPA receptors with a significant Ca^{2+} permeability allowing for plasticity of the neuron-glia synapses, but whether this property changes by adulthood is not known. Moreover, it is unclear whether NG2 glia express auxiliary transmembrane AMPA receptor related proteins (TARPs), which modify AMPA receptor properties, including their Ca^{2+} permeability. Through combined molecular and functional analyses, here we show that hippocampal NG2 glia abundantly express TARPs $\gamma 4$, $\gamma 7$, and $\gamma 8$ as well as cornichon (CNIH)-2. TARP $\gamma 8$ undergoes profound downregulation during development. Receptors of adult NG2 glia showed an increased sensitivity to blockers of Ca^{2+} permeable AMPA receptors, but this increase mainly concerned receptors located close to the soma. Evoked synaptic currents of NG2 glia were also sensitive to blockers of Ca^{2+} permeable AMPA receptors. The presence of AMPA receptors with varying Ca^{2+} permeability during postnatal maturation may be important for the cells' ability to sense and respond to local glutamatergic activity and for regulating process motility, differentiation, and proliferation.

Keywords: NG2 glia, hippocampus, AMPA receptor, TARP, Ca^{2+} permeability, developmental regulation

HIGHLIGHTS

- The Ca^{2+} permeability of AMPA receptors in NG2 glia of the hippocampus increases during postnatal maturation.
- This increase was proven by applying solutions with Ca^{2+} as the sole permeant ion as well as receptor inhibition by polyamines.
- The AMPA receptor complexes are associated with various auxiliary subunits, particularly TARPs $\gamma 4$, $\gamma 7$, $\gamma 8$, and CNIH-2.
- The developmental increase of Ca^{2+} permeability of the receptors accompanies downregulation of TARP $\gamma 8$.

INTRODUCTION

AMPA receptors co-assemble with auxiliary subunits, called transmembrane AMPA receptor regulatory protein (TARP), which modulates receptor function. The subunit TARP $\gamma 2$, also called stargazin, is necessary for surface translocation and synaptic expression of AMPA receptors as demonstrated in cerebellar granule cells (Chen et al., 2000; Tomita et al., 2005). Meanwhile a whole family of TARPs has been identified, which show region specificity in their expression and interact with AMPA receptors in various cell types (Mauric et al., 2013). Thus, in the hippocampus TARP $\gamma 4$ was specifically identified in glial cells but not in neurons (Tomita et al., 2003). TARPs do not only affect translocation of the receptor channels but also influence its function such as binding affinity and efficacy, receptor desensitization and deactivation, and sensitivity to intracellular polyamine block [reviewed by Jackson and Nicoll (2011)]. In heterologous expression systems and cerebellar stellate cells, TARP expression may affect polyamine block and enhance channel conductance (Soto et al., 2007; Jackson et al., 2011). Furthermore it was suggested that TARPs may influence the Ca^{2+} permeability of AMPA receptors (Kott et al., 2009). Specifically, co-assembly with distinct TARPs determines the Ca^{2+} permeability of the receptors. In stellate cells of the cerebellum, TARP $\gamma 2$ promotes synaptic expression of Ca^{2+} impermeable AMPA receptors while its deletion increased the proportion of extrasynaptic Ca^{2+} permeable AMPA receptors associated with TARP $\gamma 7$ (Bats et al., 2012). In granule cells, however, synaptic localization of Ca^{2+} permeable AMPA receptors requires TARP $\gamma 7$, while $\gamma 2$ promotes expression of Ca^{2+} impermeable AMPA receptors at postsynapses (Studniarczyk et al., 2013). TARP $\gamma 8$ is predominantly expressed in the hippocampus, striatum and amygdala, but not in the cerebellum (Tomita et al., 2003; Fukaya et al., 2005). Genetic deletion of TARP $\gamma 8$ led to mislocation of AMPA receptors and impaired synaptic plasticity in hippocampal neurons (Rouach et al., 2005). The preferred expression of TARP $\gamma 8$ in the hippocampus initiated the search for inhibitors of this subunit to prevent hyperexcitation as observed in temporal lobe epilepsy or anxiety disorders (Maher et al., 2017). Another family of AMPA receptor-associated proteins is formed by the cornichons (CNIHs), among which CNIH-2 and CNIH-3 are abundantly expressed in the brain and assemble with GluA subunits (Schwenk et al., 2009). CNIHs increase surface expression of AMPA receptors in neural cells and slow deactivation and desensitization of glutamate-evoked responses (Schwenk et al., 2009). CNIH-2 has been shown to modulate receptor gating and pharmacology of AMPA receptor-TARP complexes (Kato et al., 2010; Gill et al., 2011).

NG2 glial cells express functional AMPA receptors and receive direct synaptic input from glutamatergic neurons (Bergles et al., 2000; Jabs et al., 2005; Haberlandt et al., 2011). In cultured oligodendrocyte precursor cells (OPCs) from optic nerve as well as in CG4 cells, concomitant activation of metabotropic glutamate receptors (mGluRs) increases expression of Ca^{2+} permeable AMPA receptors, while activation of P2Y receptors led to a decrease (Zonouzi et al., 2011). The latter study also

suggested that AMPA receptors in OPCs co-assemble with TARPs to influence expression of Ca^{2+} permeable AMPA receptors at climbing fiber-NG2 glia synapses of the cerebellum. RT-PCR data from optic nerve OPCs identified TARP subunits $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$, $\gamma 5$, and $\gamma 6$. Microarray analysis in PDGFR α -positive NG2 glia (OPCs) from mouse forebrain revealed abundant expression of TARP $\gamma 4$, $\gamma 8$ and, to a lower extent, $\gamma 5$ (Cahoy et al., 2008). Expression of Ca^{2+} permeable AMPA receptors requires full length TARPs, which interact with the postsynaptic scaffold protein PSD-95 (Zonouzi et al., 2011). Bergmann glia express Ca^{2+} permeable AMPA receptors lacking GluA2 (Saab et al., 2012), which are associated with TARP $\gamma 5$ to modify rectification properties and influence surface expression of the receptors (Soto et al., 2009).

NG2 glial cells in the hippocampus express AMPA receptors with an intermediate Ca^{2+} permeability (Seifert and Steinhäuser, 1995; Seifert et al., 1997b). In newborn mice, the receptors of these cells are Ca^{2+} permeable (Seifert et al., 2003). Their activation provokes intracellular Ca^{2+} elevations (Jabs et al., 1994; Haberlandt et al., 2011; Barron and Kim, 2019), which constitute the basis for plasticity of neuron-glia synapses (Ge et al., 2006). During maturation, Ca^{2+} permeability and sensitivity to intracellular polyamine block of the receptor channels decrease (Seifert et al., 2003; Ge et al., 2006). In hilar NG2 glia, amplitude and frequency of receptor-mediated synaptic currents increase (Mangin et al., 2008) while in the hippocampus, synaptic connectivity decreases in older mice (Passlick et al., 2016) and AMPA receptors are downregulated (Kukley et al., 2010).

Expression and functional consequences of TARPs in NG2 glia of the hippocampus have not yet been studied during development. Here we report that these cells abundantly express TARPs $\gamma 4$, $\gamma 7$, and to a lower extent $\gamma 8$. In addition, the auxiliary subunit CNIH-2 was found in almost all cells analyzed. During postnatal development, expression of most TARPs and CNIH-2 was downregulated. Our functional analyses revealed that the sensitivity to polyamine block of Ca^{2+} permeable receptors increases in maturing NG2 glia. Moreover, the proportion of Ca^{2+} permeable AMPA receptors at the soma increases during development, which is accompanied by downregulation of TARP $\gamma 8$.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of Brain Slices and Acutely Isolated Cells

Transgenic mice [NG2ki-EYFP (Karram et al., 2008)] of postnatal days (p) 6-12 (referred to as p10) and p40-76 (p60) were anaesthetized, sacrificed by decapitation and their brains were dissected, washed, and the hemispheres were cut into 300 μm thick slices in frontal or horizontal orientation using a vibratome (Leica Microsystems VT 1200S, Wetzlar, Germany). Slice preparation was performed at 6°C in ACSF supplemented with sucrose (preparation solution). Subsequently, slices were stored for at least 30 min in preparation solution at 35°C and afterward in ACSF at room temperature. ACSF was gassed with

carbogen. Preparation solution contained (in mM): 87 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 7 MgSO₄, 0.5 CaCl₂, 25 glucose, 25 NaHCO₃, and 105 sucrose (325 mOsm, pH 7.4). For acute cell isolation, slices were stored in HEPES-buffered solution lacking nominal Ca²⁺ (pH 7.4; 6°C).

Patch Clamp-Recordings *in situ*

Membrane currents were measured with the patch-clamp technique in the whole-cell configuration. Current signals were amplified (EPC-7 or EPC 800, HEKA elektronik, Lambrecht, Germany), filtered at 3 and 10 kHz and sampled at 10 and 100 kHz by an interface connected to a computer system, which also served as a stimulus generator. The resistance of the patch pipettes was 2–4 MΩ (borosilicate glass; Hilgenberg). Capacitance compensation was used to improve voltage clamp control. The input resistance was determined by stepping the membrane from –70 to –60 mV. To block K⁺ channels, Na⁺ channels and GABA_A receptors, Ba²⁺ (100 μM), quinine (200 μM), TTX (0.5 μM) and picrotoxin (100 μM) was added to the bath solution. AMPA receptor agonists, modulators and blockers were applied *via* the bath solution. The artificial cerebrospinal fluid (aCSF) contained (in mM): 126 NaCl, 3 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 glucose, 26 NaHCO₃ (gassed with carbogen, pH 7.4, 310 mOsm). The pipette solution was composed of (in mM): 130 KCl, 0.5 CaCl₂, 2 MgCl₂, 5 BAPTA, 10 HEPES, and 3 Na₂-ATP (pH 7.28). Recordings were obtained at room temperature.

For analysis of postsynaptic currents, a CsCl-based pipette solution was used (in mM): 120 CsCl, 2 MgCl₂, 0.5 CaCl₂, 5 BAPTA, 10 Hepes, 3 Na₂-ATP, 10 TEA. Stimulation of Schaffer collaterals was performed through a chlorinated silver electrode inserted in a low resistance (<1 MΩ), aCSF-filled glass capillary which served as a monopolar stimulation electrode. Pulse sequences were generated with an AM-Systems isolation pulse stimulator (model 2100, Jerusalem, Israel). The stimulation electrode was positioned close to the patch electrode (distance ~60 μm, pulse duration 100 μs). Responses were analyzed with custom-written macros in Igor Pro 8 software (Wavemetrics). Stimulus artifacts were offline compensated by subtracting averaged failures. Recordings were obtained at 35°C.

Recordings From Freshly Isolated Cells

Freshly isolated cells were obtained from slices after protease treatment as described (Matthias et al., 2003). K⁺ channel blockers (100 μM Ba²⁺, 100 μM quinine) as well as AMPA receptor agonists, blockers and modulators were applied by transferring the cells with a tube electrode to the different solutions (Seifert and Steinhäuser, 1995). Membrane currents were measured in the whole-cell configuration as described above. The resistance of the patch pipettes was 4 MΩ, the input resistance was determined as described above. The bath solution contained (in mM): 150 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES, and 10 glucose (pH 7.4). The pipette solution was the same as for slice recordings. For recordings in high Ca²⁺ solution, 150 mM NaCl was replaced by 50 mM CaCl₂ and adjusted with *N*-methyl-D-glucamine (NMDG) to an osmolarity of 320 mOsm (pH 7.4). As for recording synaptic currents (cf.

above), CsCl-based pipette solution was used. Recordings were obtained at room temperature. Salts and buffers were purchased from AppliChem (Darmstadt, Germany), kainate and CTZ were received from Abcam (Milton, United Kingdom), Nasp from Alomone Labs (Israel), and IEM-1460, JNJ 55511118 and GYKI53655 from Tocris (Bristol, United Kingdom).

Single-Cell RT-PCR

Single-cell transcript analysis was performed as previously reported (Seifert et al., 1997a; Matthias et al., 2003). Briefly, after slice recording the cell at the tip of the pipette was lifted above the slice and aspirated into the recording pipette under microscopic control. The cell content and ~3 μl of the pipette solution were expelled into a reaction tube containing 3 μl of DEPC-treated water. Only single cells without any adherent tissue debris were selected for the analysis. The reaction tube was frozen and stored at –80°C until reverse transcription (RT). The RT mastermix contained first strand buffer (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), dithiothreitol (DTT, 10 mM), dNTPs (4 μM × 250 μM; Applied Biosystems, Darmstadt, Germany), RNasinTM (20 U; Promega, Mannheim, Germany), random hexamer primers (50 μM; Roche, Mannheim, Germany), and reverse transcriptase (SuperscriptIII, 100 U, Invitrogen). The reaction mix was added to the harvested cell content, final volume was 10 μl, and the reaction mix was incubated at 37°C for 1 h. A multiplex two-round single-cell PCR was performed with primers for TARPs, CNIH-2 and the housekeeping gene PDGFRα. The first PCR was performed after adding PCR buffer, MgCl₂ (2.5 mM), dNTP (4 μM × 50 μM), primer (200 nM each), and 5 U *Taq* polymerase (Invitrogen) to the RT product (final volume 50 μl). Thirty-five cycles were performed (denaturation at 94°C, 25 s; annealing at 51°C, 2 min for the first five cycles, and 45 s for the remaining cycles; extension at 72°C, 25 s; final elongation at 72°C, 7 min). An aliquot (2 μl) of the PCR product was used as a template for the second PCR (35 cycles; annealing at 54°C, first five cycles: 2 min, remaining cycles: 45 s) using nested primers (**Supplementary Table 1**). The conditions were the same as described for the first round, but Platinum *Taq* polymerase (2.5 U; Invitrogen) was added. Products were identified with gel electrophoresis. As a positive control, total RNA from mouse brain was run in parallel. Negative controls were performed using distilled water or bath solution for RT-PCR.

FAC Sorting and RT-qPCR

NG2ki-EYFP mice (p10 and p60, male and female) were sacrificed and their brains were dissected and the hippocampus was isolated under microscopic control (Stereo microscope, Zeiss, Germany). A cell suspension was prepared by mincing the tissue, digesting in papain (37°C, 15 min) and incubating with DNaseI [10 min; Neural Dissociation Kit (P), Miltenyi, Germany]. Fluorescent NG2 glial cells were identified by their EYFP fluorescence (emission at 527 nm) and sorted by a FACSAriaIII flow cytometer (70 μm nozzle, BD Biosciences, Heidelberg, Germany) into tubes containing Hanks' balanced salt solution (HBSS, Ca²⁺- and Mg²⁺-free). After centrifugation (2,000 g, 10 min) the supernatant was discarded and the cells were suspended in 200 μl lysis/binding buffer (Invitrogen, Darmstadt,

Germany), frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . Messenger RNA was isolated from isolated cells by cell lysis in the lysis/binding buffer and by using oligo(dT)25-linked Dynabeads (Invitrogen). The beads with adherent mRNA were suspended in DEPC-treated water (20 μl). For first strand synthesis, RT was performed using oligo-dT₂₄-primer (5 μM , Eurogentec). The reaction mix was incubated for 1 h at 50°C (final volume 40 μl).

The reaction mixture for real-time PCR contained Takyon real-time PCR mastermix (Eurogentec, Seraing, Belgium) and Taqman primer/probe mix (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany). One μl of the RT product was added, the reaction volume was 12.5 μl . PCRs for the respective target genes and β -actin, as a housekeeping gene, were run in parallel wells for each sample (triplicates for each sample). Water served as a negative control in each run. After denaturation (95°C , 10 min), 50 cycles were performed (denaturation at 95°C , 15 s; primer annealing and extension at 60°C , 60 s; thermocycler CFX 384, Biorad, Munich, Germany). Fluorescence intensity was read out during each annealing/extension step. Target gene/ β -actin expression ratios were determined by comparing C_T values of the target gene with those of the reference gene, β -actin. Relative quantification of different genes was determined according to the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method:

$$X_{\text{target}}/X_{\beta\text{-actin}} = E^{\text{CT}\beta\text{-actin}}/E^{\text{CTtarget}}, \quad (1)$$

yielding a gene ratio with X being the input copy number and C_T the cycle number at threshold. The amplification efficiency for TARP $\gamma 2$ was 1.89, for $\gamma 4$ 1.90, for $\gamma 7$ 1.92, for $\gamma 8$ 1.96, for CNH-2 1.98, and for β -actin 1.94. For the AMPA receptor subunits the amplification efficiencies were 1.95 (GluA1, GluA3) and 1.96 (GluA2, GluA4).

Data Analysis

The rectification index (RI) of receptor currents was determined by comparing the chord conductance of agonist/blocker-sensitive currents at -70 and $+70$ mV or $+40$ mV according to:

$$\text{RI} = [I_{+70\text{mV}}/(+70\text{mV} - E_{\text{rev}})]/[I_{-70\text{mV}}/(-70\text{mV} - E_{\text{rev}})], \quad (2a)$$

$$\text{RI} = [I_{+40\text{mV}}/(+40\text{mV} - E_{\text{rev}})]/[I_{-70\text{mV}}/(-70\text{mV} - E_{\text{rev}})], \quad (2b)$$

where I is the amplitude of the currents at $+70$, $+40$, and -70 mV, respectively, and E_{rev} its extrapolated reversal potential.

Data were tested for Gaussian distribution by the Shapiro-Wilk tests and for homogeneity of variance with Levene's test, followed by a two sample *t*-test or Mann-Whitney-*U*-test with or without Welch correction for equal or diverse variance. In case of paired data, a paired *t*-test or Wilcoxon signed rank test was performed. For group analyses, we used two-way ANOVA followed by Tukey or Holm's *post hoc* test, in case of non-parametric data, aligned rank transformed ANOVA

followed by Mann-Whitney-*U*-Test or Wilcoxon signed rank test with Holm's correction for multiple comparisons. Tests were performed with the software R (R Development Core Team¹). Non-Gaussian distributed data are displayed in box plots showing median (central line), quartiles (25 and 75%; box) and whiskers (± 1.5 times the interquartile range). Statistical significance of gene expression by single-cell RT-PCR was analyzed by χ^2 test. Significance level was set to $P < 0.05$. Except box plots, data are given as mean \pm SD. n and N refer to the number of cells and mice, respectively.

RESULTS

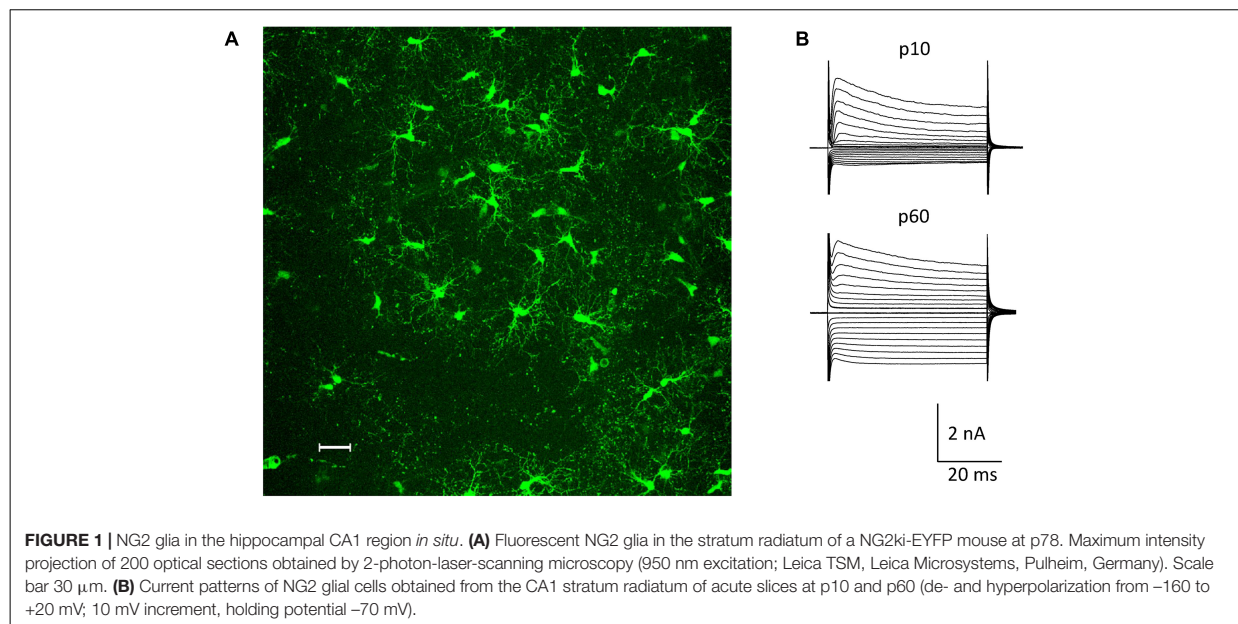
Pharmacological Characterization of Ca^{2+} Permeable AMPA Receptors in Brain Slices From Juvenile and Adult Mice

The NG2ki-EYFP mouse line has been extensively characterized and allows for identification of NG2 glia prior to electrophysiological recordings and cell identification for flow cytometry (Karram et al., 2008). NG2⁺ cells located next to blood vessels were excluded from this study to avoid mix up with NG2⁺ pericytes (Figure 1A). NG2 glial cells were identified by their EYFP fluorescence, characteristic morphology and current pattern (small Na^+ inward currents, prominent A-type K^+ currents, inwardly rectifying K^+ currents with the latter increasing with age; e.g. (Moshrefi-Ravassdiani et al., 2017; Seifert and Steinhäuser, 2018; Figure 1B).

At p10, adding the K^+ channel blockers quinine (200 μM) and Ba^{2+} (100 μM) to the bath shifted the resting potential of the NG2 glial cells from -85 mV (median; quartiles: -75 – -90 mV) to -50 mV (-55 to -44 mV) and increased the input resistance from 225 M Ω (165–320 M Ω) to 1,000 M Ω (833–2,000 M Ω , $n = 26$ cells, $N = 6$ mice). Subsequent application of kainate (250 μM) induced inward currents of -5.85 pA/pF (-5.14 to -7.93 pA/pF) ($V = -70$ mV; $n = 20$, $N = 6$) (Figures 2A,C). Although spermine was added to the pipette solution (50 μM) to block outward currents through Ca^{2+} permeable receptors, we still observed significant outward rectification (RI = 1.77, 1.60–1.94) (Figures 2B,D). The reversal potential of the responses was -0.1 mV (-1.2 to 7.0 mV; Figure 2B). Increasing the spermine concentration to 100 μM did not change rectification (1.58, 1.44–1.86, $n = 6$, $N = 2$, $p = 0.298$). Next we co-applied kainate (250 μM) with 1-naphthyl-acetyl-spermine (Naspm; 100 μM) to detect putative currents through Ca^{2+} permeable AMPA receptors (Koike et al., 1997). While the reversal potential slightly increased in the presence of Naspm (from -0.1 mV, -1.2 – 7.0 mV to 4.8 mV, 0.1 – 12.8 mV; $n = 20$, $p < 0.001$), RI did not change (1.69, 1.59–1.96, $n = 20$, $N = 5$) (Figure 2D). Naspm reduced the kainate-induced currents by $8.1 \pm 12.1\%$ ($V = -100$ mV; Figure 2A, left).

At p60, the K^+ channel blockers induced a depolarization from -87 mV (-84 to -90 mV) to -65 mV (-70 to -52 mV)

¹<http://www.R-project.org>



while the input resistance increased from 80 M Ω (66–104 M Ω) to 714 M Ω (625–1,000 M Ω , $n = 41$, $N = 9$; $p < 0.001$). The lower input resistance in these older mice reflected the cells' increased Kir conductance (Seifert and Steinhäuser, 2018). Application of kainate (250 μM , with 50 μM spermine in the pipette) induced inward currents of -7.86 pA/pF (-70 mV; -4.20 to -11.7 pA/pF), which reversed current direction at -0.2 mV (-3.2 – 7.3 mV), showed an RI of 1.24 (1.12–1.38, $n = 41$, $N = 9$) and were completely blocked by NBQX (10 μM) (Figures 2A–D). This stronger rectification compared to the juvenile stage ($p < 0.001$) might have indicated a more efficient spermine block and hence an elevated Ca^{2+} permeability in NG2 glia from the older mice. In the presence of Nasp, RI was 1.36 (1.28–1.46, $n = 8$; $N = 3$), i.e., lower than at juvenile stage (Figure 2D), but the efficiency of Nasp-dependent inhibition of kainate-induced currents (by $15.5 \pm 16.8\%$ at $V = -100$ mV) did not change during maturation.

Recently it was reported that intracellular application of Nasp completely blocks outward currents through GluA2-lacking, Ca^{2+} permeable AMPA receptors and that this block, in contrast to intracellular spermine block, does not depend on TARP expression (Coombs et al., 2021). Indeed, with Nasp (100 μM) in the pipette solution (Figures 2E,F), we observed stronger rectification of kainate-induced responses (p10: RI = 1.44 ± 0.30 , $n = 18$, $N = 3$, $p < 0.01$; p60: RI = 1.03 ± 0.17 , $n = 18$, $N = 3$, $p < 0.01$). At p60, the blocking effect of intracellular Nasp was also stronger than at p10 ($p < 0.01$) (Figures 2F,G).

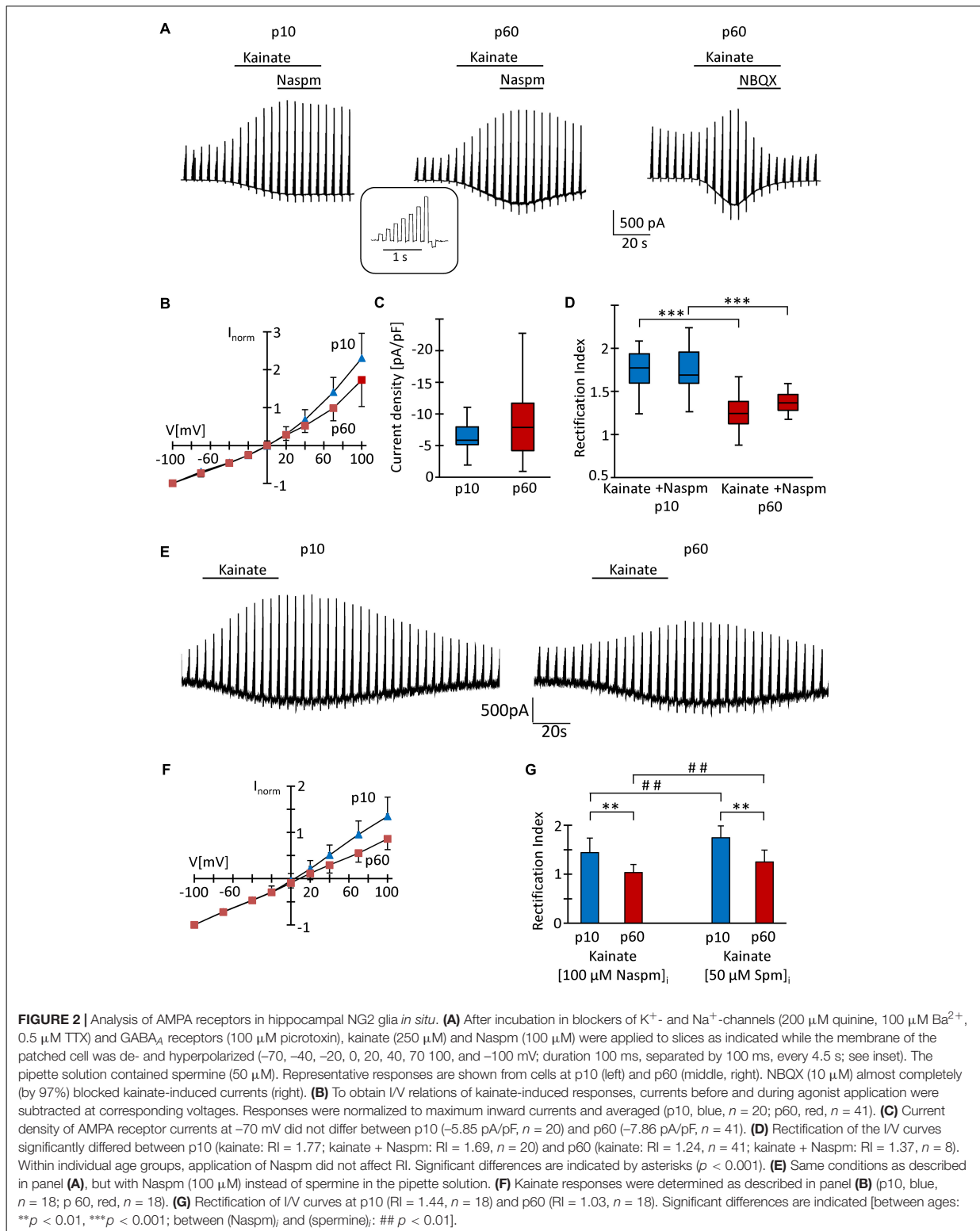
Intracellular polyamines block outward currents through Ca^{2+} permeable, GluA2-lacking AMPA receptors (Bowie and Mayer, 1995; Donevan and Rogawski, 1995; Kamboj et al., 1995), which reduces rectification (Koh et al., 1995; Toth and McBain, 1998; Soto et al., 2007). Thus, in line with previous findings

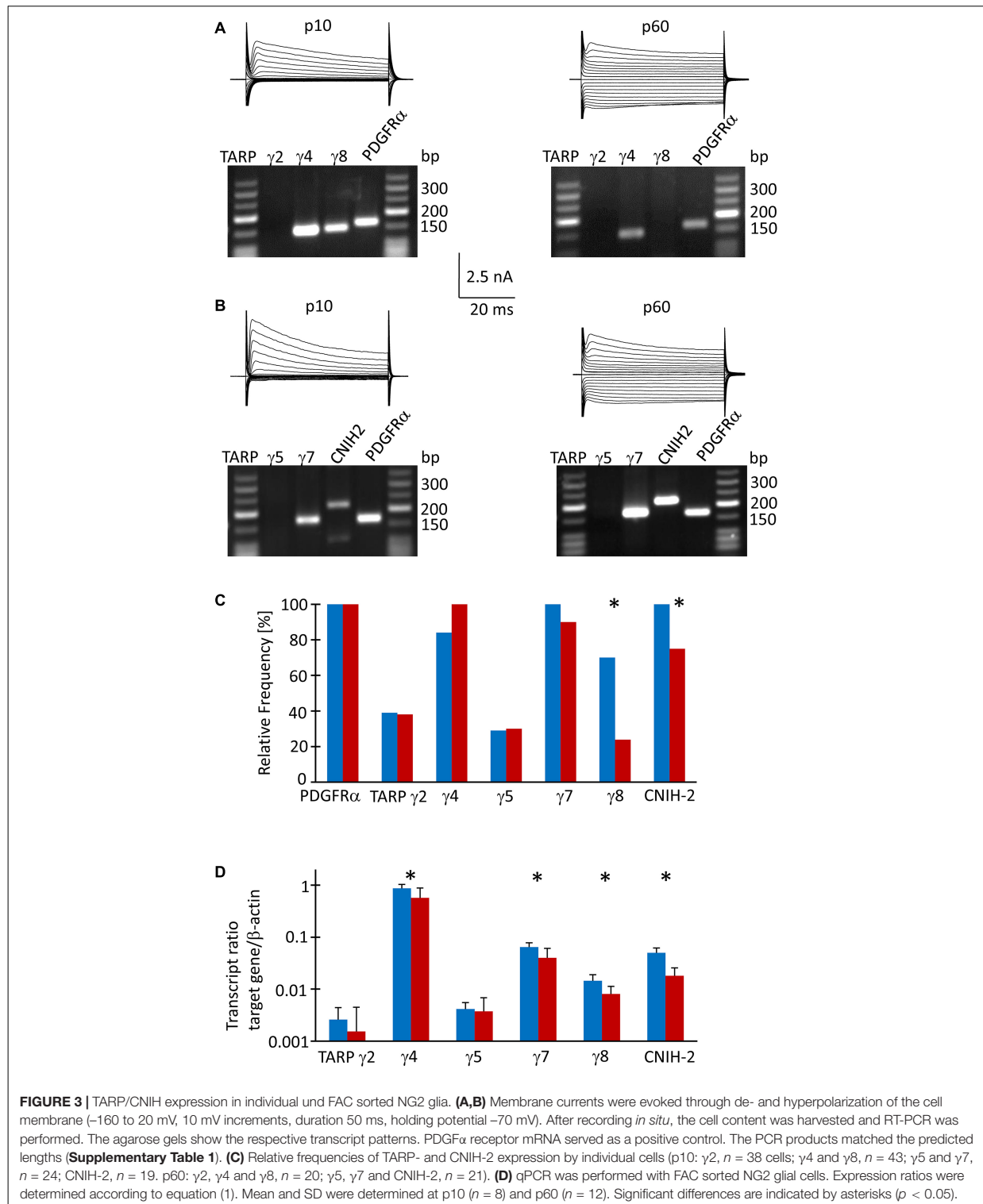
(Seifert and Steinhäuser, 1995; Seifert et al., 2003), our data confirm a low Ca^{2+} permeability of AMPA receptors in juvenile NG2 glia which, judged by the lower RI, increased by adulthood.

Developmental Regulation of TARPs and CNIHs in Hippocampal NG2 Glia

Since TARPs and CNIHs affect the intracellular polyamine block and may accompany Ca^{2+} permeable AMPA receptor subunits, we analyzed their expression by NG2 glial cells. First, multiplex single cell RT-PCR was performed after electrophysiological characterization of the cells in acute slices, using PDGFR α mRNA as a NG2 glia-specific marker. This marker was found in all cells harvested (p10, $n = 64$; p60, $n = 43$). We found heterogeneous expression of auxiliary subunits in NG2 glia. At p10, a majority of cells expressed TARP $\gamma 4$ (80%, $n = 43$), TARP $\gamma 7$ (100%, $n = 24$), TARP $\gamma 8$ (67%, $n = 43$), and CNIH-2 (100%, $n = 19$) while TARP $\gamma 2$ and TARP $\gamma 5$ were less frequent (37%, $n = 38$ and 29%, $n = 24$, respectively) (Figures 3A,B). At p60, a similar expression pattern was observed: TARP $\gamma 4$ (95%, $n = 21$), TARP $\gamma 7$ (86%, $n = 20$) and CNIH-2 (71%, $n = 20$) were most abundant while TARPs $\gamma 2$ and $\gamma 5$ were less frequent (36%, $n = 21$ and 29%, $n = 20$). However, the expression of TARP $\gamma 8$ differed, declining to 23% at p60 ($n = 21$, $p = 0.0005$), and CNIH-2 was also less abundant than at p10 ($n = 20$, $p = 0.02$) (Figure 3C).

To receive quantitative information as to the expression of the auxiliary subunits, real-time PCR was performed with cDNA from FAC sorted NG2 glial cells isolated from the hippocampus of EYFP mice, using β -actin as a housekeeping gene. At p10, TARP $\gamma 4$ was most abundant (expression ratio 0.864 ± 0.166 , $n = 8$), followed by TARP $\gamma 7$ (0.064 ± 0.014 , $n = 8$) and CNIH-2 (0.05 ± 0.011 , $n = 8$). Expression of the hippocampus-specific subunit $\gamma 8$ was low in NG2 glia (0.014 ± 0.004 ,





$n = 8$). TARP $\gamma 2$ and $\gamma 5$, which are abundantly present in the cerebellum, were expressed at a low level while TARP $\gamma 3$ was absent (Figure 3D). At p60, the relation between the individual auxiliary subunits remained similar, although expression was generally lower (TARP $\gamma 4$, 0.570 ± 0.313 , $n = 12$; TARP $\gamma 7$, 0.040 ± 0.021 , $n = 12$; CNIH-2, 0.018 ± 0.008 , $n = 12$; TARP $\gamma 8$, 0.008 ± 0.003 , $n = 12$) (Figure 3D). Expression of TARP $\gamma 2$ and TARP $\gamma 5$ was close to the detection threshold and showed no developmental regulation.

Next, we compared expression of mRNA for the subunits GluA1-4 in FAC-sorted NG2 glia from mice at both ages, using again β -actin as a housekeeping gene. At p10, GluA2 was most abundant (expression ratio 0.102 ± 0.059), followed by GluA3 (0.050 ± 0.023), GluA4 (0.030 ± 0.014) and GluA1 (0.017 ± 0.008 , $n = 10$ for all) (Supplementary Figure 1). A similar expression pattern was found at p60 (GluA2, 0.098 ± 0.066 ; GluA3, 0.035 ± 0.025 ; GluA4, 0.025 ± 0.018 ; GluA1, 0.013 ± 0.018 ; $n = 10$ for all) (Supplementary Figure 1).

Pharmacological Characterization of Ca^{2+} Permeable AMPA Receptors in NG2 Glia Freshly Isolated From p10 Mice

Because the slow application of the receptor blockers, diffusion barriers and putative indirect effects of drug application in slices might have compromised the results, we characterized properties of AMPA receptors also in acutely isolated NG2 glial cells. The developmental differences in TARP $\gamma 8$ expression also led us to test the effect of a TARP $\gamma 8$ antagonist, JNJ55511118 (further on called JNJ; Maher et al., 2016), in addition to the more global blockers of Ca^{2+} permeable AMPA receptors, Naspmm and IEM-1460 (Magazanik et al., 1997).

After fresh isolation, NG2 glia was identified by their intrinsic fluorescence. At p10, addition of quinine and Ba^{2+} ($100 \mu\text{M}$ both) to the bath depolarized the cells from $-28.2 \pm 15.8 \text{ mV}$ to $-16.2 \pm 8.0 \text{ mV}$ and increased their input resistance from $1,285 \pm 847 \text{ M}\Omega$ to $2,152 \pm 2,044 \text{ M}\Omega$ ($n = 35$, $N = 13$) (Figure 4A). With spermine ($50 \mu\text{M}$) in the pipette, kainate ($250 \mu\text{M}$) together with the AMPA receptor modulator cyclothiazide ($100 \mu\text{M}$) induced inward currents of $161.4 \pm 124.4 \text{ pA/pF}$ ($n = 35$, $N = 13$, $V = -70 \text{ mV}$) (Figure 4B). The I/V relations of the kainate-induced responses revealed a reversal potential (V_{rev}) of $-1.5 \pm 8.9 \text{ mV}$ and $\text{RI} = 1.26 \pm 0.27$ ($n = 35$, $N = 13$), confirming previous findings (Figure 4C; Seifert et al., 2003). GYKI53655 reduced the AMPA receptor currents by $97 \pm 4\%$ ($n = 11$, $N = 9$) (Figure 4D), with the RI of GYKI-sensitive currents being 1.44 ± 0.46 ($V_{\text{rev}} = -2.8 \pm 10.2 \text{ mV}$).

To further characterize expression of Ca^{2+} permeable AMPA receptors and putative involvement of TARP $\gamma 8$ in kainate-induced responses of NG2 glia, JNJ was applied subsequent to Naspmm or IEM-1460. Naspmm ($50 \mu\text{M}$) decreased the inward currents (by $53.1 \pm 18.3\%$, $V = -70 \text{ mV}$, $n = 15$, $N = 11$) while the subsequent application of JNJ ($10 \mu\text{M}$) led to a further block of the kainate-induced currents (by $19.8 \pm 14.7\%$, $n = 6$, $N = 5$) (Figure 4B). With the blockers in reverse order, JNJ at $10 \mu\text{M}$ reduced currents by $30.5 \pm 6.9\%$ ($n = 8$, $N = 5$) while addition of Naspmm led to a further reduction by $30.2 \pm 11.8\%$ ($n = 7$;

$N = 4$) (Figure 4B). To avoid putative non-specific effects, we reduced the JNJ concentration to $1 \mu\text{M}$. Under these conditions, JNJ reduced the currents by $15.1 \pm 5.3\%$ ($n = 10$, $N = 4$, $V = -70 \text{ mV}$), which was less compared to block by $10 \mu\text{M}$ JNJ ($p < 0.001$; Supplementary Figure 2C). The Naspmm ($50 \mu\text{M}$)-mediated block of JNJ ($1 \mu\text{M}$)-insensitive currents was not different from the values obtained with $10 \mu\text{M}$ JNJ ($36.8 \pm 11.4\%$, $n = 9$; $N = 4$) (Supplementary Figures 2A,C). These data demonstrated that despite the inefficacy of intracellular spermine, extracellularly applied spermine analogs profoundly affected the receptor currents in juvenile hippocampal NG2 glia. Naspmm and JNJ showed an additive inhibition. The reversal potential of the Naspmm-sensitive responses was $0.2 \pm 8.9 \text{ mV}$, with $\text{RI} = 0.55 \pm 0.27 \text{ mV}$ ($n = 21$, $N = 11$) (Figure 4C), indicating that these currents were indeed mediated by Ca^{2+} permeable receptors. The corresponding I/V relations of JNJ-sensitive currents is outward rectifying ($V_{\text{rev}} = -7.2 \pm 14.1 \text{ mV}$, $\text{RI} = 1.28 \pm 0.36$, $n = 12$, $N = 6$) (Figure 4E). Notably, a significant proportion of the responses remained in the presence of both blockers ($10 \mu\text{M}$ JNJ: $38.3 \pm 19.2\%$, $n = 13$, $N = 6$; $1 \mu\text{M}$ JNJ: $45.9 \pm 11.1\%$, $n = 11$, $N = 4$) (Figures 4E,G; Supplementary Figure 2C).

To confirm the above findings another, structurally related blocker of Ca^{2+} permeable AMPA receptors was used, IEM-1460. IEM-1460 ($100 \mu\text{M}$) blocked $38.8 \pm 10.8\%$ of the kainate responses ($V = -70 \text{ mV}$, $n = 11$, $N = 4$). Compared to Naspmm, this blocking efficacy was lower ($p = 0.03$). Subsequent application of JNJ further reduced the receptor currents (by $20.6 \pm 9.2\%$, $n = 10$, $N = 4$) (Figure 4D). Vice versa, if JNJ was applied first, the responses were reduced by $34.7 \pm 6.7\%$ ($n = 7$; $N = 4$) and additionally by $28.2 \pm 10\%$ through IEM-1460 ($n = 6$, $N = 4$). Again, $40.5 \pm 9.4\%$ ($n = 16$, $N = 4$) of the responses were insensitive to both inhibitors (Figure 4G). IEM-sensitive currents reversed at $-3.9 \pm 6.1 \text{ mV}$ and showed inward rectification ($\text{RI} = 0.4 \pm 0.32$, $n = 17$, $N = 4$) (Figure 4E). In contrast, JNJ-sensitive currents were again outward rectifying ($\text{RI} = 1.31 \pm 0.55$, $V_{\text{rev}} = -3.9 \pm 8.2$, $n = 16$, $N = 4$) (Figure 4E).

JNJ still blocked part of the Naspmm- or IEM-1460-insensitive currents. Vice versa, after initial application of JNJ, Naspmm and IEM-1460 still blocked Ca^{2+} permeable receptors. Thus, TARP $\gamma 8$ is mainly associated with Ca^{2+} -impermeable AMPA receptors.

Pharmacological Characterization of Ca^{2+} Permeable AMPA Receptors in NG2 Glia Freshly Isolated From Mice at p60

At p60, quinine and Ba^{2+} depolarized the cells (from $-23.6 \pm 11.5 \text{ mV}$ to $-15.9 \pm 8.1 \text{ mV}$) and increased the input resistance (from $877 \pm 418 \text{ M}\Omega$ to $1,958 \pm 1,416 \text{ M}\Omega$; $n = 20$, $N = 10$) (Figure 5A). Co-application of kainate and cyclothiazide induced similar inward currents as at p10 ($191.1 \pm 182.8 \text{ pA/pF}$, $V = -70 \text{ mV}$, $n = 20$, $N = 10$). With spermine ($50 \mu\text{M}$) in the pipette solution, the kainate-induced currents reversed at $-0.5 \pm 6.0 \text{ mV}$. RI was 0.98 ± 0.26 ($n = 20$) indicating linear I/V relationships, which differed from the outward rectifying responses seen in juvenile NG2 glia (Figures 5B,C;

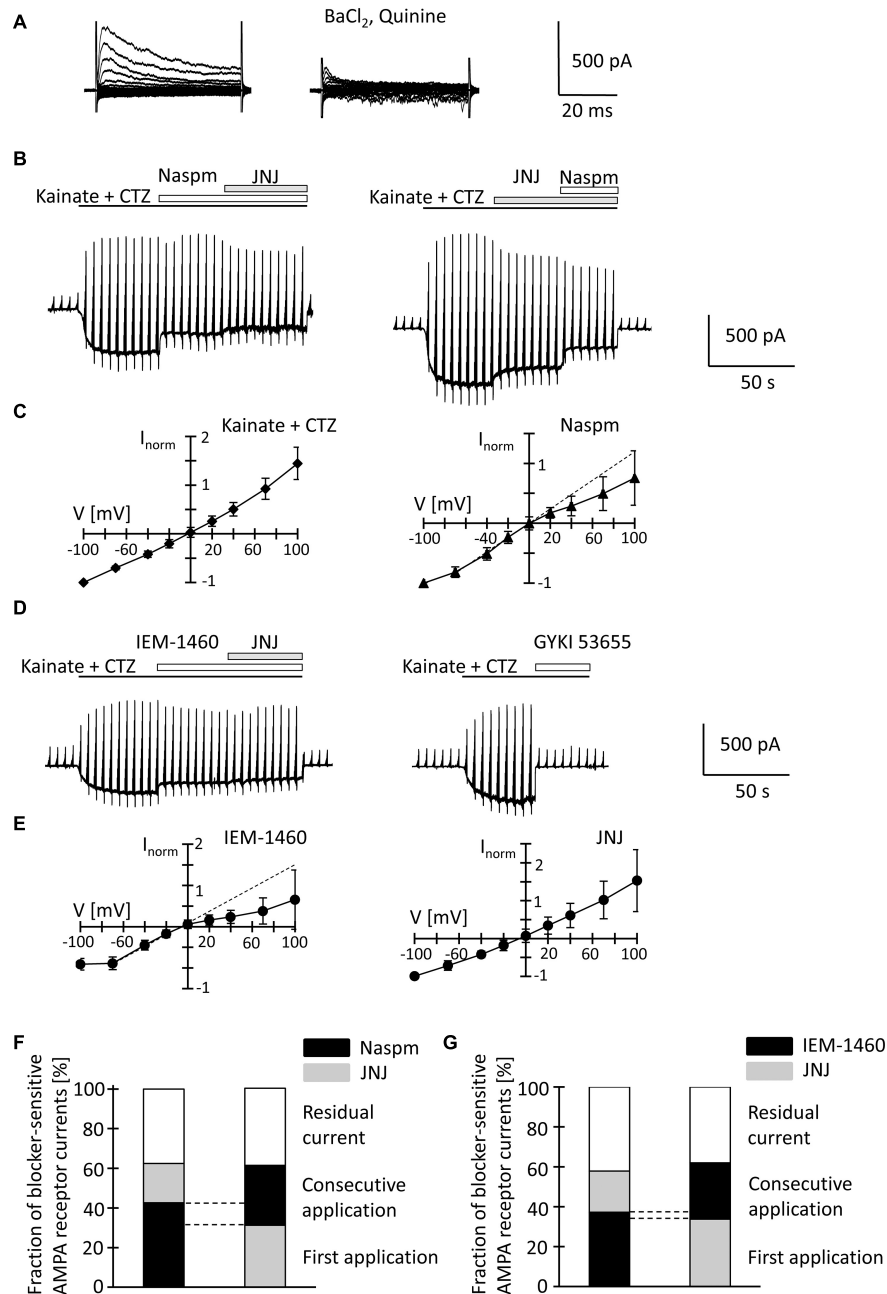


FIGURE 4 | Inhibition of AMPA receptor currents by blockers of Ca^{2+} permeable receptors and a TARP γ 8 inhibitor in freshly isolated NG2 glia at p10. **(A)** Membrane currents were elicited as described in **Figure 2** (left, normal bath solution; right, after adding 100 μM quinine and 10 μM BaCl_2). **(B)** The membrane was de- and hyperpolarized as explained in **Figure 2A** and kainate (250 μM), CTZ (100 μM), Naspmm (50 μM) and the TARP γ 8 inhibitor, JNJ 55511118 (10 μM), were applied as indicated. **(C)** shows mean I/V relations of kainate-induced current ($n = 35$; left) and the Naspmm-sensitive component ($n = 21$; right). Currents were normalized to maximal inward currents in each cell. The blocker-sensitive currents were determined by successively calculating the difference between the current amplitude in the presence of the blocker and the amplitude in the presence of the preceding substance. **(D)** Using the protocols explained in panel **(B)**, AMPA receptor currents were elicited and blocked by adding IEM-1460 (100 μM), JNJ (10 μM), and GYKI 53655 (100 μM). **(E)** Mean I/V relations of IEM-1460- ($n = 17$; left) and JNJ-sensitive currents ($n = 19$; right). **(F,G)** Relative fractions of AMPA receptor currents sensitive to Naspmm, IEM-1460 and JNJ. The order of consecutive applications has been reversed. Overlapping sensitivity to both blockers is indicated by dashed lines. The relative respective inhibition was averaged [**(F)** $n = 6$ and 7; **(G)** $n = 10$ and 6, respectively]. Only those cells are shown in which both blockers could be successfully applied consecutively.

$p = 0.0005$). GYKI53655 almost completely blocked the responses (by $97 \pm 5\%$, $n = 6$, $N = 4$). RI of GYKI-sensitive currents was 1.00 ± 0.13 ($V_{rev} = -2.8 \pm 8.3$ mV) (Figure 5D).

Naspm (50 μ M) exerted a much stronger inhibition than at p10 (by $77.4 \pm 15.2\%$, -70 mV, $n = 10$, $N = 6$, $p = 0.002$). Subsequent co-application of JNJ (10 μ M) led to further reduction of the responses (by $5.6 \pm 5.7\%$, $n = 4$, $N = 3$) (Figure 5B). With the blockers applied in reverse order, 10 μ M JNJ reduced currents by $50.5 \pm 20.0\%$ ($n = 6$, $N = 3$) while subsequent co-application of Naspm further reduced the currents by $44.0 \pm 24.0\%$ ($n = 5$, $N = 3$) (Figure 5B). At a concentration of 1 μ M, JNJ-induced inhibition (by $24.4 \pm 8.7\%$; $n = 10$, $N = 4$) was weaker ($p < 0.05$) (Supplementary Figures 2B,C), but more efficient than at p10 ($p < 0.05$). Subsequent block by Naspm (50 μ M) was as efficient as after application of JNJ at the higher concentration (by $53.8 \pm 9.7\%$, $n = 9$, $N = 4$), but stronger than at p10 ($p = 0.01$). The reversal potential of Naspm-sensitive currents was -1.3 ± 9.0 mV, with RI = 0.74 ± 0.39 mV ($n = 15$; $N = 7$), indicating that the current were partially mediated by Ca^{2+} permeable receptors. JNJ-blocked currents reversed at -1.4 ± 7.1 mV and showed outward rectification (RI = 1.20 ± 0.51 , $n = 8$; $N = 3$) (Figures 5C,D). The proportion of blocker-insensitive receptor currents was much smaller than at p10 ($5.8 \pm 10.1\%$, $n = 9$, $N = 3$, $p = 0.0001$) (Figure 5F). In 6/9 cells, inhibition of the responses was even virtually complete. These results indicate that AMPA receptors in NG2 glia at p60 show a higher Ca^{2+} permeability, and that JNJ may also inhibit part of the Naspm-sensitive currents.

IEM-1460 (100 μ M) inhibited $63.1 \pm 6.4\%$ ($V = -70$ mV, $n = 6$, $N = 3$) of the receptor currents, thus being more efficient than at p10 ($p < 0.001$) but less efficient than Naspm at p60 ($p = 0.028$). IEM-sensitive currents showed strong inward rectification (RI = 0.30 ± 0.31 , $V_{rev} = -2.9 \pm 7.6$ mV, $n = 12$, $N = 3$) (Figures 5D,E). Subsequent co-application of JNJ exerted additional inhibition (by $19.3 \pm 7.3\%$) and the JNJ-sensitive currents were again outwardly rectifying (RI = 1.46 ± 0.91 , $V_{rev} = -1.3 \pm 7.1$, $n = 12$) (Figures 5D,E). When JNJ was applied before adding IEM-1460, inhibition was 54.7 ± 5.4 and $27.2 \pm 6.1\%$ ($n = 6$, $N = 3$). Inhibition by JNJ was more effective than at cells at p10 ($p = 0.00007$), and the proportion of currents insensitive to the co-applied blockers was lower than at the early stage (10 μ M JNJ: $17.8 \pm 8.2\%$, $n = 12$, $N = 3$, $p < 0.001$; 1 μ M JNJ: $21.8 \pm 8.0\%$, $n = 12$, $N = 4$, $p < 0.001$) (Figure 5G and Supplementary Figure 2C). In contrast to Naspm, consecutive application of IEM-1460 and JNJ showed only a small overlap (Figures 5D,G).

Together, the data demonstrate that extracellularly applied spermine analogs inhibit AMPA receptors in hippocampal NG2 glia. The efficiency of inhibition by Naspm and IEM-1460 was higher in NG2 glia from adult mice. Naspm and JNJ showed a partly overlapping block. Since there was almost no overlap of IEM-1460- and JNJ-mediated inhibition, it seems that Naspm also blocked some Ca^{2+} impermeable receptors. In line with the observations at p10, the data suggested that JNJ blocked Ca^{2+} impermeable receptors. Although molecular analysis revealed developmental downregulation of TARP $\gamma 8$, the modulatory effect of JNJ was stronger in adult NG2 glia.

Ca^{2+} Permeability of Glial AMPA Receptors

To quantify the Ca^{2+} permeability of NG2 glia AMPA receptors, Na^+ -free extracellular solution with Ca^{2+} (50 mM) as the sole charge carrier was used. Kainate/CTZ induced currents in high Ca^{2+} solution, indicating Ca^{2+} permeability of the glial AMPA receptors. The permeability coefficient P_{Ca}/P_{Cs} was calculated according to the constant field equation (Mayer and Westbrook, 1987; Seifert and Steinhäuser, 1995). In juvenile mice, the ratio I_{Ca}/I_{Na} of kainate-evoked responses was $4.1 \pm 1.2\%$ (Figure 6A). The I/V relations changed from a linear shape in Na^+ solution to strong outward rectification in high Ca^{2+} solution (Figure 6B). The reversal potential of kainate/CTZ-evoked responses in high Ca^{2+} solution was -34.7 ± 10.0 mV, and the permeability ratio P_{Ca}/P_{Cs} amounted to 0.25 ± 0.18 ($n = 6$; $N = 4$) (Figures 6C,D).

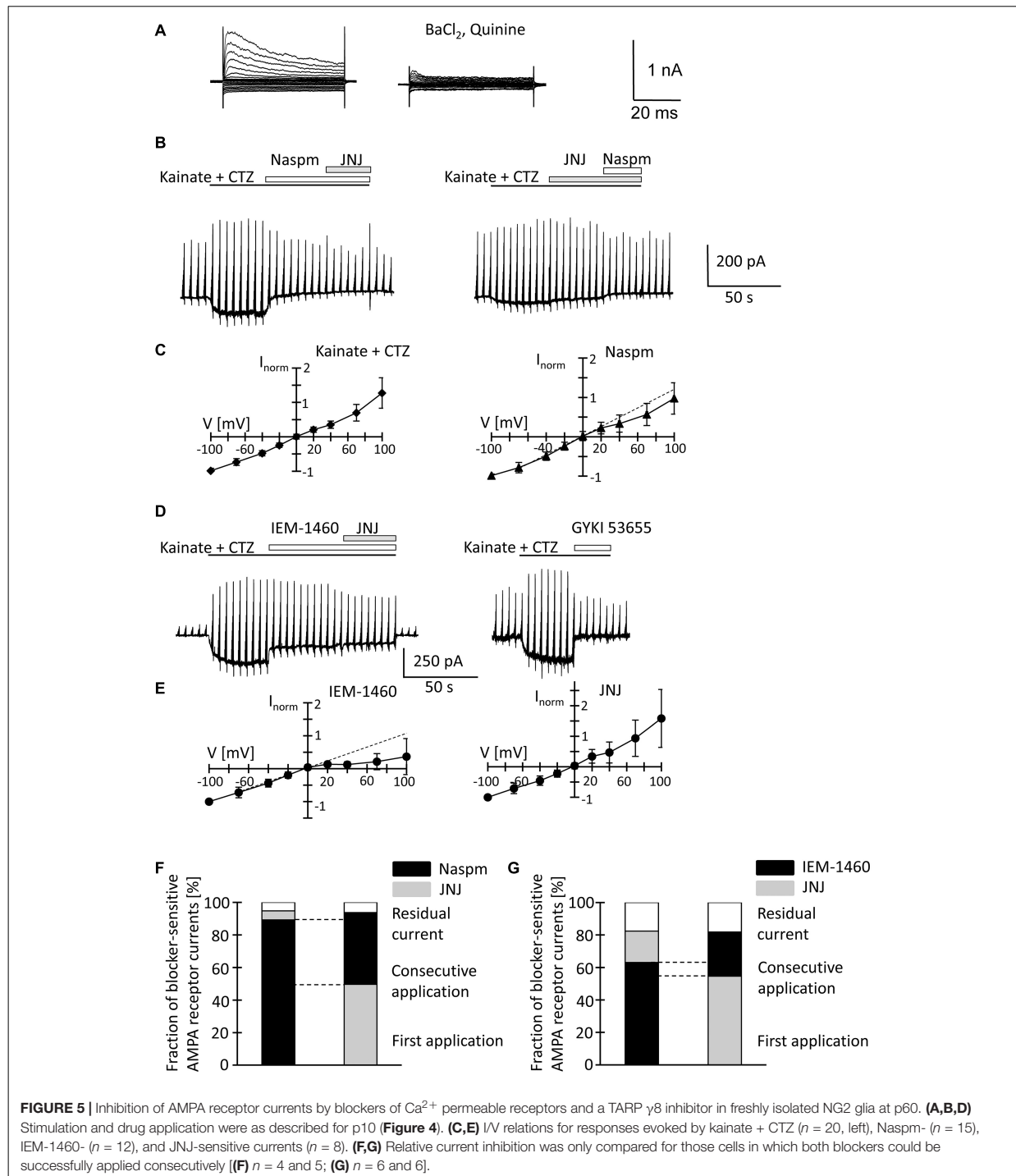
Since the inhibitory effects of Naspm and IEM-1460 were stronger at p60, we performed the same analysis at the older stage. Here, we found $I_{Ca}/I_{Na} = 5.5 \pm 1.6\%$, a reversal potential in high Ca^{2+} solution at -35.1 ± 10.7 mV, and $P_{Ca}/P_{Cs} = 0.24 \pm 0.13$ ($n = 6$; $N = 5$) (Figures 6A,C,D). None of those parameters differed from the juvenile stage and they were in accordance with previous data (Seifert et al., 1997b). Thus, the overall Ca^{2+} permeability of the receptors was similar at both stages. However, in NG2 glia from older mice, the higher blocking efficacy of Naspm and IEM-1460 and the enhanced polyamine block indicated expression of a mosaic of Ca^{2+} permeable and impermeable receptors.

Characterization of Postsynaptic Responses in NG2 Glia of the Hippocampal CA1 Region

Acute isolation of cells from the tissue shears off many of the fine processes. Thus, the properties reported above should have largely represented receptors located close to the soma, while previous work found them mostly at postsynapses on the processes (Haberlandt et al., 2011). Therefore, we tested the sensitivity of postsynaptic currents of NG2 glia to Naspm and IEM-1460. Stimulation of Schaffer collaterals was performed in the presence of cyclothiazide (100 μ M) and picrotoxin (100 μ M). Naspm (50 μ M) and IEM-1460 (100 μ M) similarly reduced synaptic currents (p10, by $31.2 \pm 14.4\%$, $n = 6$, $N = 4$ and $41.1 \pm 16.8\%$, $n = 5$, $N = 3$; p60, by $31.5 \pm 10.8\%$, $n = 7$, $N = 4$ and $32.8 \pm 4.8\%$, $n = 6$, $N = 5$) (Figures 7A–D). The efficiency of inhibition was similar for IEM-1460 and Naspm and for both developmental stages. Thus, after minimal stimulation at a frequency 0.1 Hz, both blockers of Ca^{2+} permeable receptors inhibited evoked synaptic AMPA receptor responses.

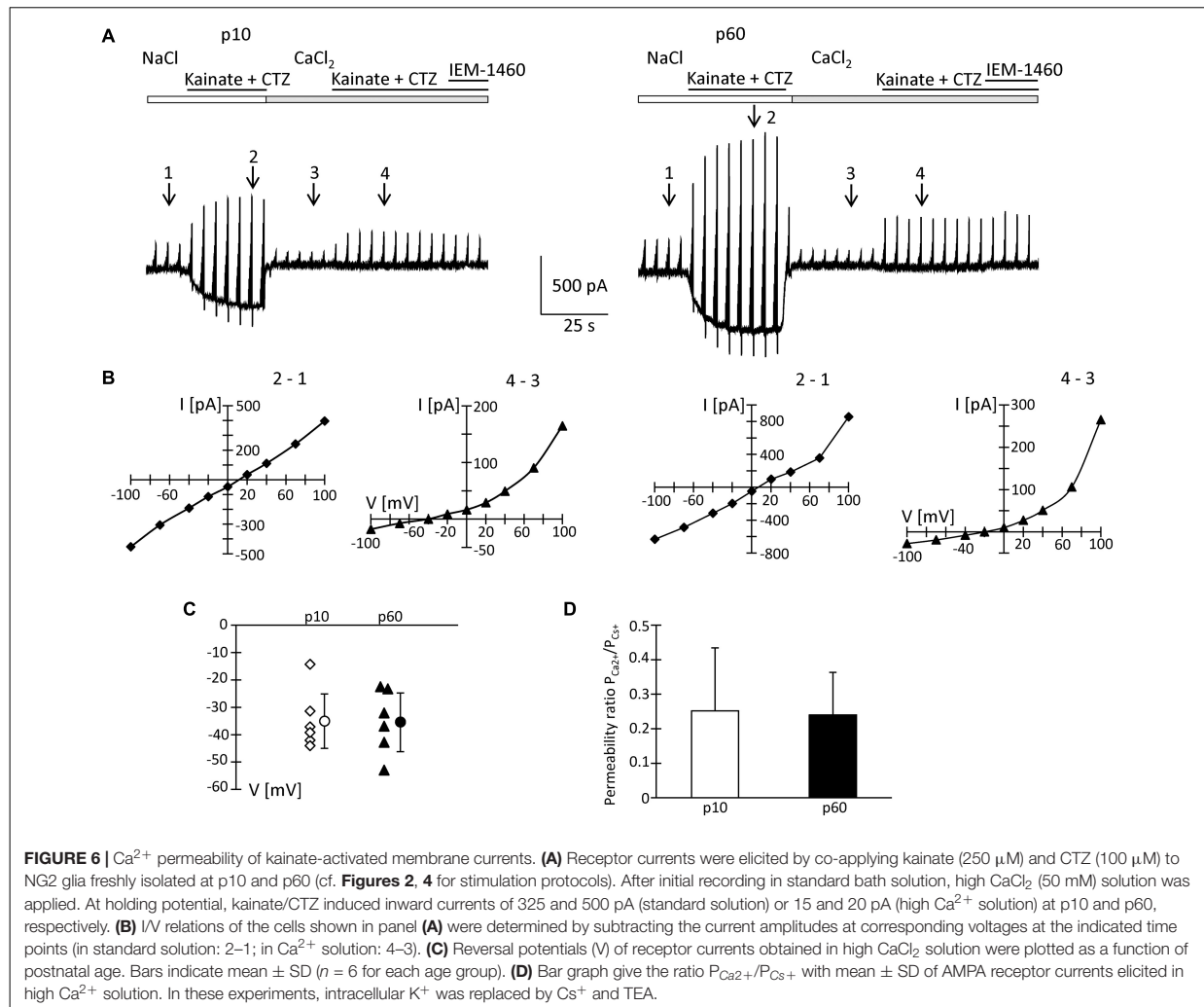
DISCUSSION

Previous functional analyses showed that early after birth, NG2 glia express Ca^{2+} permeable AMPA receptors (Seifert et al., 2003), although further details, particularly the expression of auxiliary subunits were not known. Here we addressed the question whether NG2 glial cells in the hippocampus express



TARP and CNIH subunits and whether expression changes during postnatal maturation. The data demonstrate abundant expression of TARPs $\gamma 4$, $\gamma 7$, $\gamma 8$, and CNIH-2, which declined by

maturity. Functional analyses using spermine analogs suggested enhanced expression of Ca^{2+} permeable receptors in NG2 glia of the adult hippocampus.



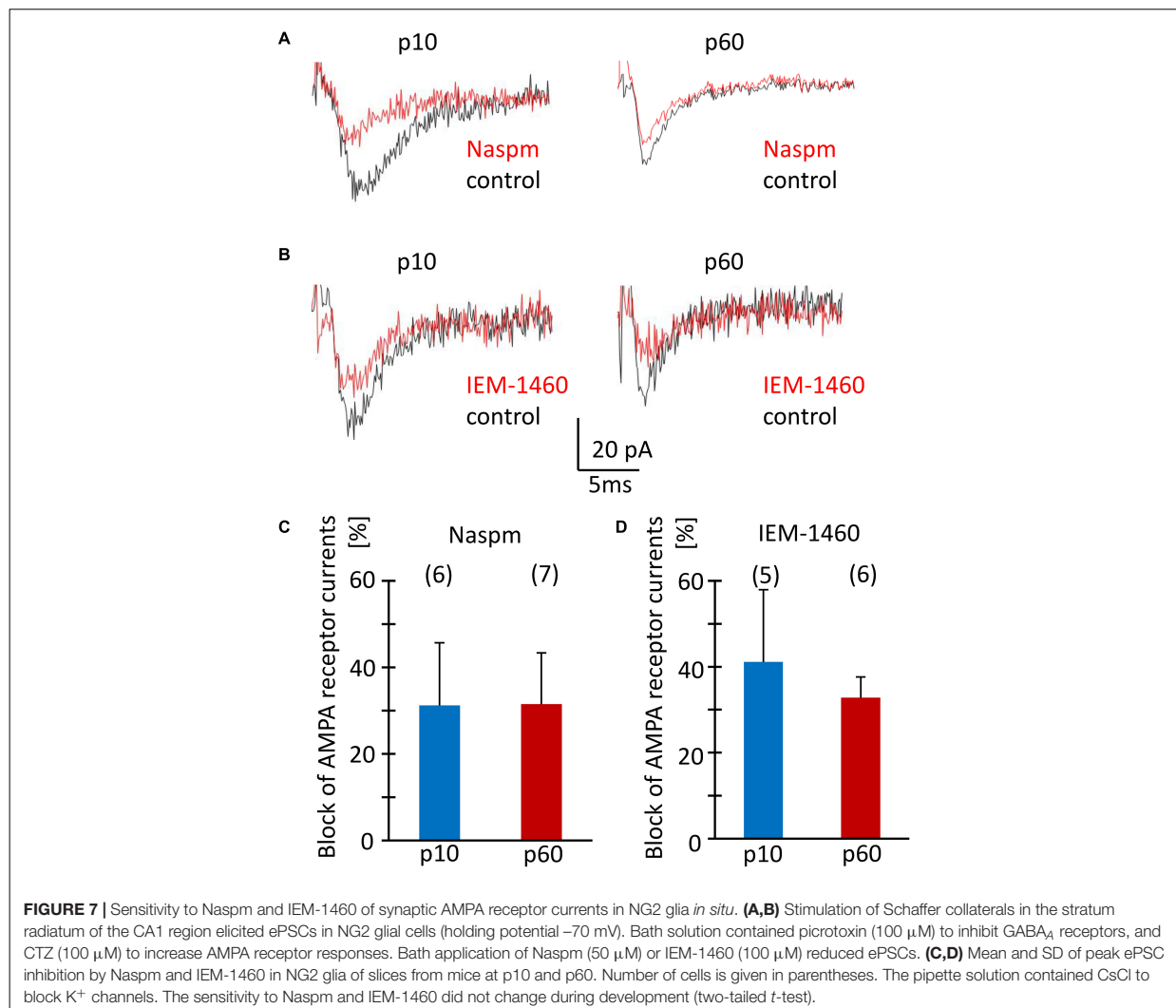
TARP and CNIH Expression in Glial Cells

The first auxiliary transmembrane protein described to interact with AMPA receptors was stargazin, later termed TARP $\gamma 2$, which is responsible for surface expression of AMPA receptors in cerebellar granule cells (Chen et al., 2000). TARP $\gamma 2$ has a PDZ-binding site, which interacts with PSD-95 and also accounts for synaptic clustering (Schnell et al., 2002). While TARP $\gamma 2$ is abundantly expressed by cerebellar granule and Purkinje cells, it is less present in other brain regions. Meanwhile, a whole gene family of TARPs was identified (Tomita et al., 2003). Because NG2 glia receives synaptic input from neurons through their AMPA receptors the question of glial TARP expression emerged. TARP $\gamma 4$ was found in glial cells of cerebellum, hippocampus, and neocortex (Tomita et al., 2003; Fukaya et al., 2005). Our molecular analysis extended these findings by revealing that in the hippocampus, NG2 glia express TARPs, with TARP $\gamma 4$ being most abundant, followed by TARPs $\gamma 7$, $\gamma 8$, and CNIH-2. Predominant expression of TARPs $\gamma 4$ and $\gamma 7$ was also found with

RNA-Seq analysis (Larson et al., 2016). A characteristic feature of $\gamma 4$ is its strong expression in the embryonic and early postnatal brain and subsequent down-regulation. Expression of CNIH-2 similarly decreased during development, both on the single cell level and in FAC-sorted NG2 glia.

Consequences of TARP/CNIH Expression for AMPA Receptor Function

In our previous work we have reported molecular and functional properties of AMPA receptors in NG2 glia of the juvenile hippocampus, including Ca^{2+} permeability, splicing, and desensitization kinetics (Seifert and Steinhäuser, 1995; Seifert et al., 1997a,b; Matthias et al., 2003). Some of the earlier data appeared contradictory, e.g., the finding that enhanced expression of GluA2 flip did not entail changes in receptor desensitization (Seifert et al., 2003). The heterogeneous expression of auxiliary subunits identified in the present



study might explain this apparent discrepancy, because they profoundly affect receptor function.

In heterologous expression systems, co-expression of TARP γ 4 with GluA2 conferred high kainate efficacy to the receptor complex, slowed its desensitization and favored incomplete desensitization while rectification of the I/V relations was not altered (Korber et al., 2007). TARP γ 7 is highly expressed in the cerebellum where it binds to the scaffold protein PSD-95 and supports synaptic targeting of AMPA receptors (Kato et al., 2007). It is tempting to speculate that TARP γ 7 has a similar role in NG2 glia where it is abundantly expressed according to our data. TARP γ 8 is highly expressed in the hippocampus, both at asymmetrical postsynaptic and extrasynaptic sites. Deletion of this subunit reduced AMPA receptor density, synaptic localization and impaired the induction of long term potentiation (LTP) (Rouach et al., 2005; Fukaya et al., 2006). Both TARP γ 7 and γ 8 interact with AMPA receptors to increase their CTZ

potentiation and kainate efficacy (Gill et al., 2011). TARP γ 7 modulates GluA2 containing receptors in a subunit composition specific manner (Kato et al., 2008). In contrast to hippocampal neurons, expression of TARP γ 8 in NG2 glia was lower than TARP γ 4 and γ 7, and strongly downregulated until adulthood.

While CNIH-2 is expressed in astrocytes of the hippocampus (Schwenk et al., 2009) we found it also in the vast majority of NG2 glial cells. This subunit regulates trafficking of the receptors, slows channel gating and increases CTZ potency in cells co-expressing TARP γ 8 (Schwenk et al., 2009; Shi et al., 2010; Gill et al., 2012). Expression of TARPs and CNIH-2 can decrease the polyamine block (Coombs et al., 2012). The latter study has also found CNIH-2 protein in cultured optic nerve oligodendroglial precursor cells. In heterologous expression systems, TARPs γ 4, 7, and 8 mediate a recovery from desensitization called resensitization, which is abrogated by CNIH-2 (Kato et al., 2010). The lack of resensitization in NG2 glia

(Seifert and Steinhäuser, 1995; Seifert et al., 1997b) might thus be due to abundant expression of CNIH-2 as demonstrated in the present study.

Pharmacological Determination of Ca²⁺ Permeability of Glial AMPA Receptors

To further characterize the Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in NG2 glia, polyamine analogs were used, which recognize binding sites within the pore. Transcript expression of GluA1-4 did not change during postnatal development, with GluA2 being the most abundant subunit. GluA2 limits the Ca²⁺ permeability of the receptors and prevents polyamine binding (Bowie and Mayer, 1995; Washburn et al., 1997). TARPs and CNIH2 also attenuate polyamine block of Ca²⁺ permeable receptors (Coombs et al., 2012; Soto et al., 2014). Expression of the latter might have prevented the polyamine block in our experiments.

In NG2 glia of mice early after birth (up to p5), we observed inward rectifying receptor currents in the presence of intracellular spermine, indicating expression of Ca²⁺ permeable receptors, which disappeared by p10 (Seifert et al., 2003). In rat, however, spermine sensitivity was still observed 2 weeks postnatally (Bergles et al., 2000). Nasp and intracellular spermine also inhibited EPSCs in NG2 glia of rat hippocampus, and the efficiency of inhibition declined with increasing age (Ge et al., 2006) while in mice, we observed no developmental changes. This species difference might be due to different contributions of TARPs/CNIHs to the glial AMPA receptor complexes. The latter study also revealed a physiological significance of AMPA-receptor-mediated Ca²⁺ influx, by demonstrating long-term potentiation at neuron-NG2 glia synapses at early developmental stages.

A Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in juvenile NG2 glia has already been demonstrated with Ca²⁺ imaging (Jabs et al., 1994). In the present study, the inward rectifying I/V relations of Nasp- and IEM-1460-sensitive currents and analyses in solutions with Ca²⁺ as the sole charge carrier confirmed functional expression of Ca²⁺ permeable receptors. Masking of intracellular spermine block of outward currents through Ca²⁺ permeable AMPA receptors, as observed here, was previously demonstrated in heterologous expression systems and cultured cortical glial cells (Meucci and Miller, 1998), and might hint at variable contributions of GluA2 to the tetrameric channels [reviewed by Bowie (2012)]. The increased extracellular polyamine block of receptor currents at negative voltages, we have observed at p60, indicated enhanced expression of Ca²⁺ permeable AMPA receptors in mature NG2 glia. A recent publication demonstrated that intracellular Nasp confers complete and TARP-independent block to Ca²⁺ permeable, GluA2-lacking AMPA receptors (Coombs et al., 2021). In our study, intracellular Nasp led to inwardly rectifying I/V relations of AMPA receptor responses in 8/18 NG2 glia at p60 while at p10, 17/18 cells showed outward rectification. The inhibitory effect of Nasp and IEM-1460 on synaptic currents did not change during development. Block of evoked synaptic responses may have indicated that Ca²⁺ permeable AMPA receptors were located on postsynaptic glial membranes (Lujan et al., 2019).

Some anti-epileptic drugs, for example perampanel (Chappell et al., 2002; French et al., 2012), target AMPA receptors. However, AMPA receptor blockers harbor many undesired side effects, because of their unspecific dampening of excitation throughout the brain. The relative brain region- and/or cell type-specific expression of TARPs, for example TARP γ 2 in the cerebellum, TARP γ 8 in the hippocampus, TARP γ 4 in glial cells, might allow for the development of new drugs with better specificity. To modulate excitatory transmission in the hippocampus, the TARP γ 8 specific antagonists LY3130481 and JNJ-55511118 were developed, which leave AMPA receptor complexes lacking this auxiliary subunit unaffected (Gardinier et al., 2016; Maher et al., 2016). These antagonists inhibit excitation in the cortex and hippocampus, dampen cortical EEG activity and have anticonvulsant effects, with only mild motor and learning deficits (Kato et al., 2016; Maher et al., 2016). In our study, TARP γ 8 was downregulated during maturation, as evidenced by its lower incidence in both single cells and after bulk isolation. Unexpectedly, however, modulation by JNJ was more pronounced in NG2 glia from older mice. This result might be explained by interactions of different TARPs/CNIH-2 with the receptor complex (Schober et al., 2011).

CONCLUSION

NG2 cells in hippocampus primarily express the TARP subunits γ 4, γ 7, and γ 8 as well as CNIH-2. These auxiliary subunits may slow receptor desensitization, increase kainate efficacy and reduce the sensitivity of Ca²⁺ permeable AMPA receptors to endogenous polyamines. Ca²⁺ influx through somatic AMPA receptors may regulate proliferation and differentiation (Chen et al., 2018), and deletion of AMPA receptors in NG2 glia reduces the survival of oligodendrocytes (Kougioumtzidou et al., 2017). Systematic analysis of mice with deletions of AMPA receptor subunits in NG2 glia may help to decipher its specific role in neural signaling.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

ETHICS STATEMENT

Ethical review and approval was not required for the animal study because we only performed organ harvesting after anesthesia.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CS and GS designed and supervised the experiments. SH, DT, SP, AT, RJ, and GS performed and/or analyzed the experiments. SH, GS, and CS wrote the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (STE 552/5, SE 774/6).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2021.669717/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Barron, T., and Kim, J. H. (2019). Neuronal input triggers Ca(2+) influx through AMPA receptors and voltage-gated Ca(2+) channels in oligodendrocytes. *Glia* 10, 1922–1932. doi: 10.1002/glia.23670
- Bats, C., Soto, D., Studniarczyk, D., Farrant, M., and Cull-Candy, S. G. (2012). Channel properties reveal differential expression of TARPed and TARPless AMPARs in stargazer neurons. *Nat. Neurosci.* 6, 853–861. doi: 10.1038/nn.3107
- Bergles, D. E., Roberts, J. D., Somogyi, P., and Jahr, C. E. (2000). Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature* 6783, 187–191. doi: 10.1038/35012083
- Bowie, D. (2012). Redefining the classification of AMPA-selective ionotropic glutamate receptors. *J. Physiol.* 590, 49–61. doi: 10.1113/jphysiol.2011.221689
- Bowie, D., and Mayer, M. L. (1995). Inward rectification of both AMPA and kainate subtype glutamate receptors generated by polyamine-mediated ion channel block. *Neuron* 15, 453–462. doi: 10.1016/0896-6273(95)90049-7
- Cahoy, J. D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L. C., Zamanian, J. L., Christopherson, K. S., et al. (2008). A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J. Neurosci.* 1, 264–278. doi: 10.1523/jneurosci.4178-07.2008
- Chappell, A. S., Sander, J. W., Brodie, M. J., Chadwick, D., Lledo, A., Zhang, D., et al. (2002). A crossover, add-on trial of talampel in patients with refractory partial seizures. *Neurology* 11, 1680–1682. doi: 10.1212/wnl.58.11.1680
- Chen, L., Chetkovich, D. M., Petralia, R. S., Sweeney, N. T., Kawasaki, Y., Wenthold, R. J., et al. (2000). Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature* 6815, 936–943. doi: 10.1038/35050030
- Chen, T. J., Kula, B., Nagy, B., Barzan, R., Gall, A., Ehrlich, I., et al. (2018). In vivo regulation of oligodendrocyte precursor cell proliferation and differentiation by the AMPA-receptor subunit GluA2. *Cell Rep.* 4, 852–861. doi: 10.1016/j.celrep.2018.09.066
- Coombs, I. D., Bats, C., Sexton, C. A., Cull-Candy, S. G., and Farrant, M. (2021). Intracellular NASPM allows an unambiguous functional measure of GluA2-lacking calcium-permeable AMPA receptor prevalence. *bioRxiv [preprint]*. doi: 10.1101/2021.02.18.431828
- Coombs, I. D., Soto, D., Zonouzi, M., Renzi, M., Shelley, C., Farrant, M., et al. (2012). Cornichons modify channel properties of recombinant and glial AMPA receptors. *J. Neurosci.* 29, 9796–9804. doi: 10.1523/jneurosci.0345-12.2012
- Donevan, S. D., and Rogawski, M. A. (1995). Intracellular polyamines mediate inward rectification of Ca2+-permeable α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 9298–9302. doi: 10.1073/pnas.92.20.9298
- French, J. A., Krauss, G. L., Biton, V., Squillacote, D., Yang, H., Laurenza, A., et al. (2012). Adjunctive perampanel for refractory partial-onset seizures: randomized phase III study 304. *Neurology* 6, 589–596. doi: 10.1212/wnl.0b013e3182635735
- Fukaya, M., Tsujita, M., Yamazaki, M., Kushiya, E., Abe, M., Akashi, K., et al. (2006). Abundant distribution of TARP gamma-8 in synaptic and extrasynaptic surface of hippocampal neurons and its major role in AMPA receptor expression on spines and dendrites. *Eur. J. Neurosci.* 8, 2177–2190. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.05081.x
- Fukaya, M., Yamazaki, M., Sakimura, K., and Watanabe, M. (2005). Spatial diversity in gene expression for VDCCgamma subunit family in developing and adult mouse brains. *Neurosci. Res.* 4, 376–383. doi: 10.1016/j.neures.2005.08.009
- Gardinier, K. M., Gernert, D. L., Porter, W. J., Reel, J. K., Ornstein, P. L., Spinazze, P., et al. (2016). Discovery of the First α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor antagonist dependent upon transmembrane AMPA receptor regulatory protein (TARP) gamma-8. *J. Med. Chem.* 10, 4753–4768.
- Ge, W. P., Yang, X. J., Zhang, Z., Wang, H. K., Shen, W., Deng, Q. D., et al. (2006). Long-term potentiation of neuron-glia synapses mediated by Ca2+-permeable AMPA receptors. *Science* 5779, 1533–1537. doi: 10.1126/science.1124669
- Gill, M. B., Kato, A. S., Roberts, M. F., Yu, H., Wang, H., Tomita, S., et al. (2011). Cornichon-2 modulates AMPA receptor-transmembrane AMPA receptor regulatory protein assembly to dictate gating and pharmacology. *J. Neurosci.* 18, 6928–6938. doi: 10.1523/jneurosci.6271-10.2011
- Gill, M. B., Kato, A. S., Wang, H., and Brecht, D. S. (2012). AMPA receptor modulation by cornichon-2 dictated by transmembrane AMPA receptor regulatory protein isoform. *Eur. J. Neurosci.* 2, 182–194. doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07948.x
- Haberlandt, C., Derouiche, A., Wyczynski, A., Haseleu, J., Pohle, J., Karram, K., et al. (2011). Gray matter NG2 cells display multiple Ca-signaling pathways and highly motile processes. *PLoS One* 3:e17575. doi: 10.1371/journal.pone.0017575
- Jabs, R., Kirchhoff, F., Kettenmann, H., and Steinhäuser, C. (1994). Kainate activates Ca2+-permeable glutamate receptors and blocks voltage-gated K+ currents in glial cells of mouse hippocampal slices. *Pflügers Arch.* 42, 310–319. doi: 10.1007/bf00374787
- Jabs, R., Pivneva, T., Hüttmann, K., Wyczynski, A., Nolte, C., Kettenmann, H., et al. (2005). Synaptic transmission onto hippocampal glial cells with hGFAP promoter activity. *J. Cell Sci.* 16, 3791–3803. doi: 10.1242/jcs.02515
- Jackson, A. C., and Nicoll, R. A. (2011). The expanding social network of ionotropic glutamate receptors: TARPs and other transmembrane auxiliary subunits. *Neuron* 2, 178–199. doi: 10.1016/j.neuron.2011.04.007
- Jackson, A. C., Milstein, A. D., Soto, D., Farrant, M., Cull-Candy, S. G., and Nicoll, R. A. (2011). Probing TARP modulation of AMPA receptor conductance with polyamine toxins. *J. Neurosci.* 20, 7511–7520. doi: 10.1523/jneurosci.6688-10.2011
- Kamboj, S. K., Swanson, G. T., and Cull-Candy, S. G. (1995). Intracellular spermine confers rectification on rat calcium-permeable AMPA and kainate receptors. *J. Physiol.* 486, 297–303. doi: 10.1113/jphysiol.1995.sp020812
- Karram, K., Goebbels, S., Schwab, M., Jennissen, K., Seifert, G., Steinhäuser, C., et al. (2008). NG2-expressing cells in the nervous system revealed by the NG2-EYFP-knockin mouse. *Genesis* 12, 743–757. doi: 10.1002/dvg.20440
- Kato, A. S., Burris, K. D., Gardinier, K. M., Gernert, D. L., Porter, W. J., Reel, J., et al. (2016). Forebrain-selective AMPA-receptor antagonism guided by TARP

- gamma-8 as an antiepileptic mechanism. *Nat. Med.* 12, 1496–1501. doi: 10.1038/nm.4221
- Kato, A. S., Gill, M. B., Ho, M. T., Yu, H., Tu, Y., Siuda, E. R., et al. (2010). Hippocampal AMPA receptor gating controlled by both TARP and cornichon proteins. *Neuron* 6, 1082–1096. doi: 10.1016/j.neuron.2010.11.026
- Kato, A. S., Siuda, E. R., Nisenbaum, E. S., and Bredt, D. S. (2008). AMPA receptor subunit-specific regulation by a distinct family of type II TARPs. *Neuron* 6, 986–996. doi: 10.1016/j.neuron.2008.07.034
- Kato, A. S., Zhou, W., Milstein, A. D., Knierman, M. D., Siuda, E. R., Dotzlaw, J. E., et al. (2007). New transmembrane AMPA receptor regulatory protein isoform, gamma-7, differentially regulates AMPA receptors. *J. Neurosci.* 18, 4969–4977. doi: 10.1523/jneurosci.5561-06.2007
- Koh, D.-S., Burnashev, N., and Jonas, P. (1995). Block of native Ca²⁺-permeable AMPA receptors in rat brain by intracellular polyamines generates double rectification. *J. Physiol.* 486, 305–312. doi: 10.1113/jphysiol.1995.sp020813
- Koike, M., Iino, M., and Ozawa, S. (1997). Blocking effect of 1-naphthyl acetyl spermine on Ca²⁺-permeable AMPA receptors in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci. Res.* 1, 27–36. doi: 10.1016/s0168-0102(97)00067-9
- Korber, C., Werner, M., Kott, S., Ma, Z. L., and Hollmann, M. (2007). The transmembrane AMPA receptor regulatory protein gamma 4 is a more effective modulator of AMPA receptor function than stargazin (gamma 2). *J. Neurosci.* 31, 8442–8447. doi: 10.1523/jneurosci.0424-07.2007
- Kott, S., Sager, C., Tapken, D., Werner, M., and Hollmann, M. (2009). Comparative analysis of the pharmacology of GluR1 in complex with transmembrane AMPA receptor regulatory proteins gamma2, gamma3, gamma4, and gamma8. *Neuroscience* 1, 78–88. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.12.047
- Kougioumtzidou, E., Shimizu, T., Hamilton, N. B., Tohyama, K., Sprengel, R., Monyer, H., et al. (2017). Signalling through AMPA receptors on oligodendrocyte precursors promotes myelination by enhancing oligodendrocyte survival. *Elife* 6:e28080.
- Kukley, M., Nishiyama, A., and Dietrich, D. (2010). The fate of synaptic input to NG2 glial cells: neurons specifically downregulate transmitter release onto differentiating oligodendroglial cells. *J. Neurosci.* 24, 8320–8331. doi: 10.1523/jneurosci.0854-10.2010
- Larson, V. A., Zhang, Y., and Bergles, D. E. (2016). Electrophysiological properties of NG2(+) cells: matching physiological studies with gene expression profiles. *Brain Res.* 638, 138–160. doi: 10.1016/j.brainres.2015.09.010
- Lujan, B., Dagostin, A., and von, G. H. (2019). Presynaptic diversity revealed by Ca²⁺-Permeable AMPA receptors at the calyx of held synapse. *J. Neurosci.* 16, 2981–2994. doi: 10.1523/jneurosci.2565-18.2019
- Magazaniuk, L. G., Buldakova, S. L., Samoilova, M. V., Gmiro, V. E., Mellor, I. R., Usherwood, P. N. (1997). Block of open channels of recombinant AMPA receptors and native AMPA/kainate receptors by adamantane derivatives. *J. Physiol.* 505, 655–663. doi: 10.1111/j.1469-7793.1997.655ba.x
- Maher, M. P., Matta, J. A., Gu, S., Seierstad, M., and Bredt, D. S. (2017). Getting a handle on neuropharmacology by targeting receptor-associated proteins. *Neuron* 5, 989–1001. doi: 10.1016/j.neuron.2017.10.001
- Maher, M. P., Wu, N., Ravula, S., Ameriks, M. K., Savall, B. M., Liu, C., et al. (2016). Discovery and characterization of AMPA receptor modulators selective for TARP-gamma8. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2, 394–414.
- Mangin, J. M., Kunze, A., Chittajallu, R., and Gallo, V. (2008). Satellite NG2 progenitor cells share common glutamatergic inputs with associated interneurons in the mouse dentate gyrus. *J. Neurosci.* 30, 7610–7623. doi: 10.1523/jneurosci.1355-08.2008
- Matthias, K., Kirchhoff, F., Seifert, G., Hüttmann, K., Matyash, M., Kettenmann, H., et al. (2003). Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus. *J. Neurosci.* 5, 1750–1758. doi: 10.1523/jneurosci.23-05-01750.2003
- Mauric, V., Molders, A., Harmel, N., Heimrich, B., Sergeeva, O. A., and Klocker, N. (2013). Ontogeny repeats the phylogenetic recruitment of the cargo exporter cornichon into AMPA receptor signaling complexes. *Mol. Cell Neurosci.* 56, 10–17. doi: 10.1016/j.mcn.2013.02.001
- Mayer, M. L., and Westbrook, G. L. (1987). Permeation and block of NMDA acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. *J. Physiol.* 394, 501–527. doi: 10.1113/jphysiol.1987.sp016883
- Meucci, O., and Miller, R. J. (1998). Dissociation between the Joro spider toxin sensitivity of recombinant α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors and their ability to increase intracellular calcium. *Neuropharmacology* 37, 1431–1443. doi: 10.1016/s0028-3908(98)00147-6
- Moshrefi-Ravasdjani, B., Dublin, P., Seifert, G., Jennissen, K., Steinhäuser, C., Kafitz, K. W., et al. (2017). Changes in the proliferative capacity of NG2 cell subpopulations during postnatal development of the mouse hippocampus. *Brain Struct. Funct.* 2, 831–847. doi: 10.1007/s00429-016-1249-2
- Passlick, S., Trotter, J., Seifert, G., Steinhäuser, C., and Jabs, R. (2016). The NG2 protein is not required for glutamatergic Neuron-NG2 cell synaptic signaling. *Cereb. Cortex* 1, 51–57. doi: 10.1093/cercor/bhu171
- Rouach, N., Byrd, K., Petralia, R. S., Elias, G. M., Adesnik, H., Tomita, S., et al. (2005). TARP gamma-8 controls hippocampal AMPA receptor number, distribution and synaptic plasticity. *Nat. Neurosci.* 11, 1525–1533. doi: 10.1038/nn1551
- Saab, A. S., Neumeyer, A., Jahn, H. M., Cupido, A., Simek, A. A., Boele, H. J., et al. (2012). Bergmann glial AMPA receptors are required for fine motor coordination. *Science* 6095, 749–753. doi: 10.1126/science.1221140
- Schnell, E., Sizemore, M., Karimzadegan, S., Chen, L., Bredt, D. S., and Nicoll, R. A. (2002). Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 21, 13902–13907. doi: 10.1073/pnas.172511199
- Schober, D. A., Gill, M. B., Yu, H., Gernert, D. L., Jeffries, M. W., Ornstein, P. L., et al. (2011). Transmembrane AMPA receptor regulatory proteins and cornichon-2 allosterically regulate AMPA receptor antagonists and potentiators. *J. Biol. Chem.* 15, 13134–13142. doi: 10.1074/jbc.m110.212522
- Schwenk, J., Harmel, N., Zolles, G., Bildl, W., Kulik, A., Heimrich, B., et al. (2009). Functional proteomics identify cornichon proteins as auxiliary subunits of AMPA receptors. *Science* 5919, 1313–1319. doi: 10.1126/science.1167852
- Seifert, G., and Steinhäuser, C. (1995). Glial cells in the mouse hippocampus express AMPA receptors with an intermediate Ca²⁺ permeability. *Eur. J. Neurosci.* 7, 1872–1881. doi: 10.1111/j.1460-9568.1995.tb00708.x
- Seifert, G., and Steinhäuser, C. (2018). Heterogeneity and function of hippocampal macroglia. *Cell Tissue Res.* 3, 653–670. doi: 10.1007/s00441-017-2746-1
- Seifert, G., Rehn, L., Weber, M., and Steinhäuser, C. (1997a). AMPA receptor subunits expressed by single astrocytes in the juvenile mouse hippocampus. *Mol. Brain Res.* 4, 286–294. doi: 10.1016/s0169-328x(97)00059-4
- Seifert, G., Weber, M., Schramm, J., and Steinhäuser, C. (2003). Changes in splice variant expression and subunit assembly of AMPA receptors during maturation of hippocampal astrocytes. *Mol. Cell Neurosci.* 2, 248–258. doi: 10.1016/s1044-7431(03)00039-3
- Seifert, G., Zhou, M., and Steinhäuser, C. (1997b). Analysis of AMPA receptor properties during postnatal development of mouse hippocampal astrocytes. *J. Neurophysiol.* 6, 2916–2923. doi: 10.1152/jn.1997.78.6.2916
- Shi, Y., Suh, Y. H., Milstein, A. D., Isozaki, K., Schmid, S. M., Roche, K. W., et al. (2010). Functional comparison of the effects of TARPs and cornichons on AMPA receptor trafficking and gating. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 37, 16315–16319. doi: 10.1073/pnas.1011706107
- Soto, D., Coombs, I. D., Gratacos-Battle, E., Farrant, M., and Cull-Candy, S. G. (2014). Molecular mechanisms contributing to TARP regulation of channel conductance and polyamine block of calcium-permeable AMPA receptors. *J. Neurosci.* 35, 11673–11683. doi: 10.1523/jneurosci.0383-14.2014
- Soto, D., Coombs, I. D., Kelly, L., Farrant, M., and Cull-Candy, S. G. (2007). Stargazin attenuates intracellular polyamine block of calcium-permeable AMPA receptors. *Nat. Neurosci.* 10, 1260–1267. doi: 10.1038/nn1966
- Soto, D., Coombs, I. D., Renzi, M., Zonouzi, M., Farrant, M., and Cull-Candy, S. G. (2009). Selective regulation of long-form calcium-permeable AMPA receptors by an atypical TARP, gamma-5. *Nat. Neurosci.* 3, 277–285. doi: 10.1038/nn.2266
- Studniarczyk, D., Coombs, I., Cull-Candy, S. G., and Farrant, M. (2013). TARP gamma-7 selectively enhances synaptic expression of calcium-permeable AMPARs. *Nat. Neurosci.* 9, 1266–1274. doi: 10.1038/nn.3473

- Tomita, S., Adesnik, H., Sekiguchi, M., Zhang, W., Wada, K., Howe, J. R., et al. (2005). Stargazin modulates AMPA receptor gating and trafficking by distinct domains. *Nature* 7045, 1052–1058. doi: 10.1038/nature03624
- Tomita, S., Chen, L., Kawasaki, Y., Petralia, R. S., Wenthold, R. J., Nicoll, R. A., et al. (2003). Functional studies and distribution define a family of transmembrane AMPA receptor regulatory proteins. *J. Cell Biol.* 4, 805–816. doi: 10.1083/jcb.200212116
- Toth, K., and McBain, C. J. (1998). Afferent-specific innervation of two distinct AMPA receptor subtypes on single hippocampal interneurons. *Nat. Neurosci.* 7, 572–578. doi: 10.1038/2807
- Washburn, M. S., Numberger, M., Zhang, S., and Dingledine, R. (1997). Differential dependence on GluR2 expression of three characteristic features of AMPA receptors. *J. Neurosci.* 24, 9393–9406. doi: 10.1523/jneurosci.17-24-09393.1997
- Zonouzi, M., Renzi, M., Farrant, M., and Cull-Candy, S. G. (2011). Bidirectional plasticity of calcium-permeable AMPA receptors in oligodendrocyte lineage cells. *Nat. Neurosci.* 11, 1430–1438. doi: 10.1038/nn.2942

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Hardt, Tascio, Passlick, Timmermann, Jabs, Steinhäuser and Seifert. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

3. Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen Menschen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ich bedanke mich insbesondere bei meinem Doktorvater Prof. Christian Steinhäuser für die Überlassung dieses interessanten Themas, die Gewährung der ausgezeichneten Möglichkeiten zur Bearbeitung der Fragestellung sowie seine Unterstützung während der gesamten Promotion. Ich habe seine ruhige und wertschätzende Art der Zusammenarbeit außerordentlich geschätzt und bin auch sehr dankbar dafür, dass seine Bürotür immer für mich offenstand.

Mein besonderer Dank gilt auch meinem Arbeitsgruppenleiter Dr. Gerald Seifert, der mir mit seinem umfassenden Fachwissen eine riesige Hilfe war und mich stets tatkräftig und hilfsbereit bei allen Angelegenheiten unterstützt hat. Ich bedanke mich für seine exzellente Betreuung und für viele anregende Gespräche.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen MitarbeiterInnen des Instituts für Zelluläre Neurowissenschaften für die wertvollen Anregungen, stete Hilfsbereitschaft und gute Arbeitsatmosphäre. Ich bedanke mich bei Thomas Erdmann für seine technische Unterstützung, Lukas Hennig für seine Hilfe mit dem Programm R, Dr. Silke Künzel für ihre Hilfe bei allen Formalitäten, Dr. Roland Jabs für seine detaillierten Einführungen in die Theorie des Patch Clamping und in Statistik, Dr. Camille Philippot für ihre moralische Unterstützung, Dario Tascio für seine Hilfe bei den letzten Experimenten und Dr. Aline Timmermann für die exzellente praktische Einführung in das Labor, die Experimente und deren Auswertung.

Ich bedanke mich auch bei BONFOR für die ideelle und materielle Unterstützung meines Forschungsvorhabens.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und Freunden für die kontinuierliche Motivation und Unterstützung. Insbesondere danke ich auch Familie Kreuzer, meinen Eltern und Christina für ihre sehr hilfreichen Hinweise bei der Erstellung der deutschen Zusammenfassung.