

Funktionelle und molekulare Eigenschaften von GABA_A-Rezeptoren in NG2-Gliazellen des Hippokampus während der Entwicklung

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Linda Patt-Peckmann, geb. Patt

aus Köln

2026

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Christian Steinhäuser
2. Gutachter: Prof. Dr. Philipp Sasse

Tag der mündlichen Prüfung: 25.03.2026

Aus dem Institut für Zelluläre Neurowissenschaften

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	4
1.	Deutsche Zusammenfassung	6
1.1	Einleitung und Fragestellung	6
1.2	Material und Methoden	9
1.3	Ergebnisse	15
1.4	Diskussion	21
1.5	Zusammenfassung	24
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	26
2.	Veröffentlichung	32
3.	Erklärung zum Eigenanteil	33
4.	Danksagung	34
5.	Publikation (PDF-Version)	35

Abkürzungsverzeichnis

aCSF	artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit (artificial cerebrospinal fluid)
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure
CA1-Region	Region 1 des Cornu ammonis
CGP55845	(2S)-3-[(1S)-1-(3,4-Dichlorophenyl)ethyl]amino-2-hydroxypropylphosphinsäurehydrochlorid, GABA _B -Rezeptor-Antagonist
D-APV	2-Amino-5-phosphonovaleriansäure, NMDA-Rezeptor-Antagonist
ePSC	evozierte postsynaptische Ströme (evoked postsynaptic currents)
EYFP	verstärktes gelb-fluoreszierendes Protein (enhanced yellow fluorescent protein)
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (fluorescence activated cell sorting)
GABA	γ -Aminobuttersäure (γ -aminobutyric acid)
GARLH4	GABA _A -Rezeptor-ähnliche Protein 4 (GABA _A receptor-like protein 4)
GAT-1	GABA-Transporter Typ 1
GAT-3	GABA-Transporter Typ 3
GFP	grün-fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein)
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
KCC2	Kalium-Chlorid-Cotransporter 2
mPSC	miniature postsynaptic currents

mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NBQX	2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[<i>f</i>]chinoxalin-7-sulfonamid, AMPA-Rezeptor-Antagonist
NG2	Neurales / gliales Antigen 2
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NNC-711	1-(2-[[[(Diphenylmethylidene)amino]oxy}ethyl)-1,2,5,6-tetrahydropyridine-3-carboxylic acid, GAT-1-Inhibitor
OPC	Oligodendrozyten-Vorläuferzelle (oligodendrocyte precursor cell)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDGFR α	Plättchen-abgeleiteter Wachstumsfaktor-Rezeptor α (platelet derived growth factor receptor α)
PFA	Paraformaldehyd
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
sPSC	spontane postsynaptische Ströme (spontaneous postsynaptic currents)
SNAP-5114	(<i>S</i>)-1-[2-[Tris(4-methoxyphenyl)methoxy]ethyl]-3-piperidinecarboxylic acid, GAT-3-Inhibitor
Thy1	Thy-1-Zelloberflächenantigen
TTX	Tetrodotoxin
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung und Fragestellung

Bei NG2-Gliazellen handelt es sich um eine Untergruppe von nicht-neuronalen Zellen, die ubiquitär im zentralen Nervensystem (ZNS) vorkommen, jedoch deutlich seltener sind als andere Gliazellen wie Astrozyten (Degen et al., 2012). In der weißen Substanz differenzieren die meisten NG2-Gliazellen zu Oligodendrozyten, weshalb sie auch als Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (OPCs) bezeichnet werden (Bergles et al., 2010). Sie exprimieren das Proteoglykan neurales / gliales Antigen 2 (NG2) sowie den Plättchen-abgeleiteten Wachstumsfaktor α (PDGFR α), sodass diese zur Identifikation dieser Zellen genutzt werden können (Karram et al., 2008). In der grauen Substanz, z.B. dem Hippokampus, bleibt diese Differenzierung zu großen Teilen aus und der NG2-Phänotyp bis ins Erwachsenenalter erhalten (Dimou et al., 2008; Kang et al., 2010). NG2-Gliazellen erhalten als einzige nicht-neuronale Zellen im ZNS synaptischen Input von Neuronen und exprimieren funktionelle Rezeptoren für die Neurotransmitter Glutamat und γ -Aminobuttersäure (GABA), wie AMPA- und GABA_A-Rezeptoren (Bergles et al., 2000; Jabs et al., 2005; Lin und Bergles, 2004). Die physiologische Funktion dieser synaptischen Innervation von NG2-Gliazellen ist jedoch bislang noch nicht geklärt. Diese Arbeit konzentriert sich auf die GABAerge Signalübertragung.

Bei GABA_A-Rezeptoren handelt es sich um ionotrope Rezeptoren, die einen Kanal bilden, der für Chlorid (Cl⁻) und Hydrogencarbonat (HCO₃⁻) durchlässig ist. In adulten Neuronen führt eine Aktivierung der Rezeptoren zu einer Hyperpolarisation während in juvenilen Neuronen aufgrund des positiveren Cl⁻-Gleichgewichtspotentials, bedingt durch eine höhere intrazelluläre Cl⁻-Konzentration, eine Depolarisation ausgelöst wird (Garaschuk et al., 1998). Diese Veränderung der intrazellulären Cl⁻-Konzentration in Neuronen wird in Nagetieren während der ersten zwei Wochen postnatal reguliert. Grund dafür ist eine zunehmende Expression des Kalium-Chlorid-Cotransporters 2 (KCC2), der Kalium- und Chlorid-Ionen aus den Zellen exportiert (Rivera et al., 1999; Stein et al., 2004). NG2-Gliazellen exprimieren KCC2 nicht, weshalb die Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren in NG2-Gliazellen eine Depolarisation auslöst, da die intrazelluläre Cl⁻-Konzentration im

Laufe der postnatalen Entwicklung erhöht bleibt (Arellano et al., 2016; Passlick et al., 2013; Tanaka et al., 2009).

Ein GABA_A-Rezeptor-Kanal wird aus fünf Untereinheiten gebildet, die üblicherweise aus zwei α -, zwei β - und einer γ -Untereinheit zusammengesetzt sind. Insgesamt sind 16 verschiedene Rezeptoruntereinheiten bekannt. Je nach Kombination der Rezeptoruntereinheiten haben GABA_A-Rezeptoren unterschiedliche pharmakologische Eigenschaften, da sie allosterische Bindungsstellen für Modulatoren wie Benzodiazepine, Barbiturate, Zink und volatile Anästhetika haben (Hevers und Lüddens, 1998; Mehta und Ticku, 1999; Olsen und Sieghart, 2008). Die Benzodiazepin-Bindungsstelle beispielsweise wird an der Schnittstelle der α - und γ -Untereinheit gebildet (Mehta und Ticku, 1999). Bei dem Benzodiazepin Diazepam und Zolpidem, welches ebenfalls an der Benzodiazepin-Bindungsstelle bindet, handelt es sich um γ -Untereinheit-spezifische Modulatoren, die GABA_A-Rezeptorströme wirkungsvoll verstärken, wenn die Rezeptoren die γ 2-Untereinheit enthalten. Hierbei wirken niedrige Konzentrationen von Zolpidem selektiv auf Rezeptoren mit den α 1/ γ 2-Untereinheiten (Hevers und Lüddens, 1998; Olsen und Sieghart, 2009). Die γ 2-Untereinheit findet sich in NG2-Gliazellen in postsynaptischen GABA_A-Rezeptoren wohingegen tonische Ströme durch extrasynaptische Rezeptoren vermittelt werden, die keine γ 2-Untereinheit enthalten und Zolpidem-insensitiv sind (Balia et al., 2015; Passlick et al., 2013). Im Gegensatz zur γ 2-Untereinheit wird die α 5-Untereinheit hauptsächlich extrasynaptisch exprimiert (Olsen, 2018). Rezeptoren, die diese Untereinheit enthalten, werden vom α 5-spezifischen Inhibitor α 5IA blockiert. Aufgrund dieser Eigenschaften ist es somit möglich, postsynaptische und extrasynaptische GABA_A-Rezeptoren in NG2-Gliazellen pharmakologisch zu unterscheiden.

Strukturell ähnelt die Synapse zwischen Neuron und NG2-Gliazelle derjenigen zwischen Neuronen (Haberlandt et al., 2011). Es konnte nachgewiesen werden, dass NG2-Gliazellen Neuroligin-2 exprimieren (Passlick et al., 2016), welches in Neuronen in Interaktion mit Gephyrin und Collybistin für die Verankerung von GABA_A-Rezeptoren, die die γ 2-Untereinheit enthalten, an der Postsynapse verantwortlich ist (Davenport et al., 2017; Papadopoulos und Soykan, 2011; Pouloupoulos et al., 2009; Yamasaki et al., 2017). Weitere wichtige Gerüstproteine für die Bildung von GABA_A-Rezeptorclustern in

Neuronen sind das GABA_A-Rezeptor-ähnliche Protein 4 (GARLH4) an der Postsynapse (Davenport et al., 2017; Yamasaki et al., 2017) und Radixin, welches für extrasynaptische GABA_A-Rezeptorcluster in Interaktion mit der α 5-Untereinheit eine wichtige Rolle spielt (Hausrat et al., 2015; Loebrich et al., 2006). Ob diese Gerüstproteine auch für die Verankerung und Gruppierung von GABA_A-Rezeptoren in NG2-Gliazellen eine Rolle spielen, wurde zuvor noch nicht eingehend untersucht.

Im Barrel-Kortex, einer Region des somatosensorischen Kortex, konnte eine Veränderung der GABAergen Signalübertragung von Interneuronen zu NG2-Gliazellen von synaptischer zu extrasynaptischer Übertragung während der postnatalen Entwicklung (2. bis 4. postnatale Woche) bereits beobachtet werden. Diese funktionelle Veränderung wird vermittelt durch eine Herunterregulation der γ 2-Untereinheit in diesem Zeitraum (Balía et al., 2015; Vélez-Fort et al., 2010).

Formulierung der Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist die funktionelle und molekulare Diversität von NG2-Gliazellen des Hippokampus während der postnatalen Entwicklung zu untersuchen und hierdurch Hinweise auf die physiologische Bedeutung der GABAergen Innervation von NG2-Gliazellen zu erhalten. Hierbei stellte sich insbesondere die Frage, ob eine Veränderung der Signalübertragung wie im Barrel-Kortex stattfindet und ob diese mit einer Veränderung der molekularen Zusammensetzung der GABA_A-Rezeptoren einhergeht. Zudem untersuchten wir, ob NG2-Gliazellen die Gerüstproteine Gephyrin, Collybistin und GARLH4, die für die Bildung von postsynaptischen Rezeptorclustern in Neuronen eine wichtige Rolle spielen, sowie Radixin, welches für extrasynaptische Rezeptorverankerung relevant ist, exprimieren. Ergänzend nutzten wir Expansionsmikroskopie um die subzelluläre Lokalisation dieser Gerüstproteine zu identifizieren.

1.2 Material und Methoden

Die Experimente wurden an Gewebeschnitten einer transgenen Mauslinie mit NG2-spezifischer Fluoreszenzmarkierung durchgeführt (Karram et al., 2008). Diese Mauslinie exprimiert verstärktes gelb-fluoreszierendes Protein (EYFP) unter der Kontrolle des NG2-Promotors und erlaubt so eine zuverlässige Identifikation von NG2-Gliazellen mittels Fluoreszenzsignal nach Epifluoreszenzanregung. Es wurden zwei Entwicklungsstadien untersucht. Juvenile Mäuse im Alter von 7 – 10 Tagen (im Folgenden als p10 oder juvenil bezeichnet) wurden mit adulten Mäusen im Alter von 54 – 75 Tagen (im Folgenden als p60 oder adult bezeichnet) verglichen. Die Mäuse wurden unter Standardbedingungen gehalten (12 h/12 h Tag- und Nachtzyklus, Nahrung und Trinken nach Belieben) und die durchgeführten Experimente erfüllten alle lokalen, nationalen und europäischen Vorschriften (Tierversuchsgenehmigung 84-02.04.2015.A411, 81-02.04.2017.A437).

Akute Hirnschnitte für Elektrophysiologie und Zellgewinnung

Zur Durchführung der Experimente wurden akute Hirnschnitte angefertigt, um Zugang zu noch lebenden NG2-Zellen im Hirnschnitt zu erlangen. Die Mäuse wurden mit Isofluran betäubt und die Gehirne herauspräpariert. Anschließend wurden die Gehirne in kalter (4 °C) Präparationslösung, die konstant mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) begast wurde, mit einem Vibratom in 300 µm dicke, horizontale Schnitte geschnitten. Nach einer Inkubationszeit von 15 min in warmer (35 °C) Präparationslösung wurden die Schnitte in artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF) transferiert und bei 25 °C weiter kontinuierlich mit Carbogen oxygeniert bis zur Durchführung der Experimente (pH 7,4).

Elektrophysiologie

Die elektrophysiologischen Analysen wurden mittels Patch-Clamp-Technik durchgeführt. Hierbei ist es möglich, die elektrische Aktivität einzelner Zellen zu messen. Hierfür wurden die Hirnschnitte einzeln in eine Messkammer transferiert, die kontinuierlich mit oxygeniertem aCSF gespült wurde. Es erfolgte mikroskopisch die Identifikation der gewünschten Hirnregion. In unserem Falle erfolgten alle Experimente im Stratum radiatum der Region 1 des Cornu ammonis (CA1-Region) des Hippokampus. Die NG2-Gliazellen konnten anhand des EYFP-Fluoreszenzsignals identifiziert werden, hierbei wurden unmittelbar an Blutgefäße angrenzende Zellen (Perizyten) ausgeschlossen. Die

Identifizierung wurde anhand des charakteristischen Stromprofils der gepatchten NG2-Gliazelle bestätigt. Das Haltepotential lag bei -80 mV. Patch-Pipetten wurden aus Borosilikat-Kapillaren hergestellt und hatten einen Widerstand von 2 – 5 MOhm. Für alle Experimente, außer der Zellgewinnung für die Einzelzell-Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (Einzelzell-RT-PCR), wurden die Pipetten mit einer CsCl-basierten intrazellulären Lösung gefüllt. Zur Zellgewinnung wurde eine KCl-basierte intrazelluläre Lösung genutzt.

Zunächst wurden spontane postsynaptische Ströme (sPSC) untersucht. Um GABA_A-Rezeptor-vermittelte Ströme zu isolieren, wurde eine aCSF-Badlösung, die mit 10 µM NBQX, 50 µM D-APV und 5 µM CGP55845 versetzt war, über das Perfusionssystem in die Badkammer eingewaschen. NBQX ist ein selektiver, kompetitiver AMPA-Rezeptor-Antagonist, D-APV ein selektiver NMDA-Rezeptor-Antagonist und CGP55845 ein selektiver GABA_B-Rezeptor-Antagonist. Nach dem Einwaschen der Lösung wurde die Spontanaktivität der GABA_A-Rezeptorströme über 5 min gemessen. Zur Bestimmung von mPSC (miniature postsynaptic currents) wurde zusätzlich 0,5 µM Tetrodotoxin (TTX) zur Lösung hinzugegeben. TTX blockiert selektiv spannungsgesteuerte Natriumkanäle und damit die Weiterleitung von Aktionspotentialen, sodass in Anwesenheit von TTX gemessene postsynaptische Ströme nur auf spontanen synaptischen Ereignissen beruhen. Die Messung von mPSC erfolgte über 5-10 min. sPSC und mPSC wurden in der Auswertung durch eine Template-basierte Ereignis-Detektion identifiziert und einzeln visuell überprüft, bevor sie in die Analyse eingingen. Nur Messungen mit mindestens 2 bestätigten Events gingen in die Analyse ein.

Da spontane postsynaptische Ströme nur selten auftraten, wurden für die pharmakologische Analyse der GABA_A-Rezeptor-vermittelten Ströme evozierte postsynaptische Ströme (ePSC) gemessen. Diese wurden mittels elektrischer Nahfeld-Stimulation ausgelöst (Jabs et al., 2005). Hierzu wurde eine monopolare Stimulationselektrode aus einem Teflon-beschichteten Silberdraht mit einer chlorierten Spitze und einer aCSF-gefüllten Glaspipette (Widerstand unter 1 MOhm) genutzt. Die Stimulation erfolgte mit einzelnen biphasischen Impulsen für 100 µs alle 15 s und umfasste mindestens 40 Impulse pro Messung (ca. 10 min). Zur pharmakologischen Analyse wurden Diazepam (10 µM) und Zolpidem (1 µM) zusätzlich in die Badlösung

eingewaschen. Diazepam und Zolpidem sind γ -Untereinheit-spezifische Modulatoren von GABA_A-Rezeptoren. GABA_A-Rezeptoren ohne γ 2-Untereinheit sind weniger sensitiv gegenüber Diazepam, während Zolpidem selektiv auf α 1/ γ 2-enthaltende Rezeptoren wirkt (Hevers und Lüddens, 1998; Olsen und Sieghart, 2009). Die Experimente wurden in Anwesenheit von 10 μ M NBQX und 50 μ M D-APV durchgeführt. Es wurden sowohl die kinetischen Eigenschaften (Rise Time 20%-80% und Decay Time) sowie der Effekt von Diazepam und Zolpidem auf die maximale Amplitude (peak amplitude) für jede einzelne Zelle untersucht.

Zusätzlich zu phasischen Rezeptorantworten finden sich in NG2-Gliazellen tonische Ströme, die vor allem durch extrasynaptische GABA_A-Rezeptoren vermittelt werden. Zur Detektion von tonischen Strömen fügten wir der Badlösung für mindestens 3 min 1 mM Nipecotinsäure hinzu. Nipecotinsäure ist ein Inhibitor von GABA-Transportern und verhindert so die Wiederaufnahme von GABA aus dem extrazellulären Raum, sodass hierdurch die extrazelluläre Konzentration von GABA erhöht wird. Dann wurden zusätzlich 20 μ M Bicucullin eingewaschen. Bicucullin ist ein selektiver, kompetitiver GABA_A-Rezeptor-Inhibitor. Durch das Einwaschen von Bicucullin kann ein GABA_A-Rezeptor-vermittelter tonischer Strom demaskiert werden. Denn durch die Inhibition des GABA_A-Rezeptor-vermittelten tonischen Stroms kommt es zu einer Verschiebung des Haltestroms in Richtung höherer Auswärtsströme, die gemessen werden kann und die der Amplitude des tonischen Stroms entspricht. Um die pharmakologischen Eigenschaften der tonischen Ströme zu untersuchen wurde α 5IA, ein selektiver Inhibitor von GABA_A-Rezeptoren, die die α 5-Untereinheit enthalten, eingesetzt. Zunächst wurde 1 mM Nipecotinsäure für mindestens 3 min eingewaschen. Dann wurde 500 nM α 5IA hinzugefügt, wodurch der Teil des tonischen Stromes, der durch GABA_A-Rezeptoren mit α 5-Untereinheit vermittelt wurde, blockiert wurde. Zuletzt wurde nach 2 min zusätzlich 20 μ M Bicucullin eingewaschen, um den GABA_A-Rezeptor-vermittelten tonischen Strom vollständig zu blockieren. Die Verschiebung des Haltestroms nach Zugabe von α 5IA auf wurde anschließend auf die Verschiebung nach Zugabe von Bicucullin normiert. Dies wird im Folgenden als der relative Effekt von α 5IA bezeichnet. Hierdurch konnte bestimmt werden, wie groß der Anteil an GABA_A-Rezeptoren mit α 5-Untereinheit am tonischen Strom war.

Zellgewinnung und Einzelzell-RT-PCR

Für die Einzelzell-RT-PCR wurden einzelne Zellen mittels Patch-Clamp-Technik aus akuten Hirnschnitten gewonnen. Hierzu wurde eine KCl-basierte intrazelluläre Lösung in der Patch-Pipette verwendet. Die Zellen wurden mittels Fluoreszenzsignal unter dem Mikroskop identifiziert und elektrophysiologisch charakterisiert. Anschließend wurde die Zelle vorsichtig an der Patch-Pipette aus dem Schnitt gehoben und unter mikroskopischer Kontrolle in die Pipette aspiriert. Der vollständige Inhalt der Pipette wurde in ein Reaktionsröhrchen mit 3 μ l Diethylpyrocarbonat-behandeltem Wasser transferiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur Einzelzell-RT-PCR bei -20 °C gelagert.

Die Einzelzell-RT-PCR wurde nach zuvor berichteter Methodik durchgeführt (Matthias et al., 2003; Seifert et al., 1997). Zunächst erfolgte eine reverse Transkription (RT) der Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) nach Zugabe von RT-Puffer, Desribonukleintriphosphaten (dNTPs), zufälligen Hexamer-Primern, Ribonuklease-Inhibitor und Reverser Transkriptase (100 U) bei 37 °C für 1 h. Anschließend erfolgte eine zweischrittige Multiplex-Polymerasekettenreaktion (PCR) mit Primern für α -, β -, γ - und δ -Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors sowie PDGFR α als NG2-Gliazell-spezifischem Housekeeping-Gen (Balia et al., 2015; Passlick et al., 2013). Zur Identifizierung der α 3-Untereinheit sowie der postsynaptischen Gerüstproteine Gephyrin, Collybistin, Radixin und GARLH4 gemeinsam mit PDGFR α erfolgte eine separate PCR mit den in Tabelle 1 der Veröffentlichung aufgeführten Primern (Patt et al., 2023). Die Produkte der Einzelzell-RT-PCR wurden mittels Gelelektrophorese identifiziert. Positiv- und Negativkontrollen wurden parallel durchgeführt. Um zwischen der β 2- und β 3-Untereinheit differenzieren zu können erfolgte zusätzlich eine Restriktionsanalyse.

FACS-Analyse und semiquantitative Real-Time RT-PCR

Nach Präparation des Mäusegehirns wurde der komplette Hippokampus unter mikroskopischer Kontrolle isoliert. Hieraus wurde eine Zellsuspension gewonnen durch Zerkleinern des Gewebes, anschließende Digestion in Papain für 15 min und Inkubation in Desoxyribonuklease I für 10 min. Nach Dissoziation des Gewebes mittels Pasteur-Pipetten wurde die Zellsuspension durch ein 70 μ M Zellsieb gefiltert. Nach Zugabe von HBSS (Hanks' balanced salt solution) erfolgte eine Zentrifugation bei 300 g für 10 min.

Das zentrifugierte Pellet wurde in 1 ml HBSS gelöst und erneut durch ein 40 µM Zellsieb filtriert. Mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (FACS) mithilfe eines Durchflusszytometers wurden NG2-Gliazellen durch ihr EYFP-Fluoreszenzsignal bei 527 nm identifiziert und in Röhrchen mit HBSS sortiert. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 2000 g für 10 min, die präzipitierten Zellen wurden in 200 µl Pufferlösung gelöst, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

Die mRNA wurde nach Zellyse mittels oligo(dT)25-gebundener Dynabeads isoliert. Anschließend erfolgte zunächst die reverse Transkription und anschließend die Real-Time PCR, hierbei wurde β-actin als Referenzgen genutzt.

Immunzytochemie und Expansionsmikroskopie

Adulte Mäuse wurde mittels intraperitonealer Injektion einer Mischung Xylazin (2 %) und Ketamin (100 mg/ml) im Verhältnis 1:3 anästhesiert. Dann erfolgte eine transkardiale Transfusion mit 20-30 ml kalter (4 °C) Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) und anschließend mit 20-30 ml 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS. Die Gehirne wurden herauspräpariert und über Nacht bei 4 °C in 4 % PFA gelagert, bevor sie vor der Anfertigung der Hirnschnitte für mindestens einen Tag bei 4 °C in PBS lagerten. Mit einem Vibratom wurden in kalter (4 °C) PBS 70 µM dicke, koronare Schnitte angefertigt. Diese wurden vor der Färbung bei 4 °C in PBS mit Natriumazid gelagert.

Das Protokoll für die Expansionsmikroskopie wurde aus Asano et al. (2018), Deshpande et al. (2017) und Herde et al. (2020) adaptiert. Die fixierten Schnitte wurden über Nacht bei 4 °C in Blocking-Puffer (5 % normales Ziegenserum, 1 % Triton X-100 in PBS, pH 7,4) transferiert. Die primären Antikörper wurden für 48 h in Blocking-Puffer bei 4 °C inkubiert. Als primäre Antikörper wurden eingesetzt: Huhn anti-GFP (grün-fluoreszierendes Protein) (1:2000), Kaninchen anti-Radixin (1:200), Maus anti-Gephyrin (1:200). Nach drei Waschzyklen in PBS für 20 min erfolgte die Inkubation der sekundären Antikörper über Nacht in Blocking-Puffer bei 4 °C. Es wurden folgende sekundäre Antikörper genutzt: Ziege anti-Huhn Alexa Fluor 488 (1:200), Ziege anti-Maus Alexa-Fluor 568 (1:200) und Ziege anti-Kaninchen Biotin (1:200). Am Folgetag erfolgte nach erneutem dreimaligem Waschen in PBS die Inkubation mit Hoechst 33342 in destilliertem Wasser (1:2000) für 10 min bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen erfolgte eine Vor-Bilderfassung

des Hoechst33342-Signals mit einem 40x/ 1.1 NA – Objektiv am Konfokalmikroskop mit Aufnahme eines Z-Stacks der Körnerzellen in der Spitze des Gyrus dentatus vor Expansion, um den Expansionsfaktor bestimmen zu können. Anschließend erfolgte die Expansion der Schnitte. Hierfür erfolgte zunächst die Inkubation mit dem Linker-Molekül Methacrylsäure-N-Hydroxysuccinimid-Ester 1 mM für 1 h bei Raumtemperatur. Während dieser Reaktion erfolgt eine kovalente Anbindung von Aminogruppen der Proteine und Antikörper an Methacrylat, welches anschließend in ein Hydrogel eingebunden wird. Nach drei Waschzyklen in PBS erfolgte für 45 min eine Inkubation in Monomer-Lösung bei 4 °C und anschließend für 5 min in Gelling-Lösung bei 4 °C. Die Gelling-Lösung besteht aus Natriumacrylat, Acrylamid und N,N'-Bis-Methylenbisacrylamid und einem Polymerisationsinitiator. In der Gelling-Lösung wurden die Schnitte auf einen Glas-Objektträger platziert, mit einem Deckglas bedeckt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Es bildet sich ein Hydrogel, in dem auch die Proteine verankert worden sind. Das Deckglas und das überschüssige Gel um die Schnitte wurden entfernt und die Gele über Nacht bei 25 °C in Digestions-Puffer inkubiert. In diesem Schritt werden durch Proteinase K-Inkubation die Proteine im Hydrogel abgebaut, die Fluorophore bleiben erhalten. Am Folgetag wurde der Digestions-Puffer entfernt und die Gele mit Streptavidin Alexa Fluor 467 (1:200) in PBS für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Gele in destilliertem Wasser für 2,5 h expandiert, hierbei wurde das Wasser alle 15-20 min ausgetauscht. Zuletzt wurden die Gele in eine Poly-Lysin-beschichtete μ -Slide-Ibidi-Doppelkammer eingebracht und mit einem Poly-Lysin-beschichtetem Deckglas bedeckt. Die Bilderfassung erfolgte an einem Leica SP8 invertierten Konfokalmikroskop. Vor der Bilderfassung wurde zur Bestimmung des Expansionsfaktors ein Z-Stack der Spitze des Gyrus dentatus nach Expansion mit einem 20x/0,75 NA – Objektiv aufgenommen (Seifert et al., 2025). Die Bilder wurden mit Hilfe von der Leica-Systems-Software LASAF 3.3 und Fiji 1.53 verarbeitet.

Datenanalyse und statistische Auswertung

Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe von Igor Pro 7 und pClamp 10.0 (Template-basierte Ereignis-Detektion), die statistische Analyse erfolgte in R 3.5.0. Alle Daten wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft. Normalverteilte Daten wurden zunächst auf Varianzhomogenität überprüft (Levene-Test) und Unterschiede zwischen

den Gruppen mittels t-Test dementsprechend mit oder ohne Welch-Korrektur auf Signifikanz überprüft. Für nicht-normalverteilte Daten wurde der Mann-Whitney-U-Test eingesetzt. Für die Daten der Einzelzell-RT-PCR sowie der ePSC wurde der Chi-Quadrat-Test eingesetzt. Das Signifikanzlevel wurde bei $p < 0,05$ festgelegt. Zur Visualisierung werden Balkendiagramme (arithmetisches Mittel \pm Standardabweichung) oder Boxplots bei nicht-normalverteilten Daten (Median, 25%- und 75%-Quartil, Antenne \pm 1,5facher Interquartilsabstand) eingesetzt. Da wir keine geschlechtsspezifischen Unterschiede feststellen konnten wurden die Daten von männlichen und weiblichen Mäusen gepoolt.

1.3 Ergebnisse

Funktionelle Analysen der synaptischen GABAergen Signalübertragung in NG2-Gliazellen während der Entwicklung

Zunächst analysierten wir sPSC in NG2-Gliazellen im Alter p10 und p60. Hierzu wurde die Spontanaktivität einer einzelnen NG2-Gliazelle wie oben beschrieben über 5 min registriert und die sPSC mittels einer Template-basierten Ereignis-Detektion identifiziert und anschließend analysiert. Die Messungen erfolgten in Anwesenheit von NBQX, D-APV und CGP55845, um GABA_A-Rezeptor-vermittelte Ströme zu isolieren. Wir konnten eine Reduktion der Frequenz der sPSC im Alter p60 verglichen mit p10 feststellen (median p60: 0,0223 Hz, p10: 0,0795 Hz, $p < 0,001$). Entsprechend war das Interevent-Intervall bei adulten Mäusen länger als bei juvenilen (median p60: 40,77 s, p10: 10,59 s, $p < 0,001$; Figure 1A,B in Patt et al., 2023). Die Amplitude und die kinetischen Eigenschaften (Rise Time und Decay Time) der einzelnen Ströme zeigten keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Figure 1C,D in Patt et al., 2023). Desweiteren untersuchten wir mPSC in Anwesenheit von zusätzlich 0,5 μ M TTX. Da TTX die Weiterleitung von Aktionspotentialen verhindert, beruhen die so gemessenen postsynaptischen Ströme auf spontanen synaptischen Ereignissen, was somit einen Hinweis auf die Dichte GABAerger Synapsen gibt. mPSC traten erwartungsgemäß seltener auf als sPSC, jedoch war auch hier eine Reduktion der Frequenz (median p60: 0,0191 Hz, p10: 0,063 Hz, $p < 0,01$) und eine Verlängerung des Interevent-Intervalls (median p60: 54,02 s, p10: 15,28 s, $p < 0,01$) bei adulten Mäusen im Vergleich zu juvenilen Mäusen nachweisbar (Figure 2A,B in Patt

et al., 2023). Auch hier waren keine Unterschiede in der Amplitude und den kinetischen Eigenschaften der Ströme nachweisbar (Figure 2C,D in Patt et al., 2023).

Aufgrund dieser Ergebnisse konnten wir schlussfolgern, dass in der CA1-Region des Hippokampus eine Herabregulation der synaptischen GABAergen Signalübertragung von Interneuronen zu NG2-Gliazellen während der postnatalen Entwicklung stattfindet. Im Folgenden untersuchten wir, ob diese Herabregulation mit einer Veränderung der pharmakologischen Eigenschaften und Zusammensetzung der Rezeptoruntereinheiten einhergeht.

Da sPSC für aussagekräftige pharmakologische Analysen zu selten auftraten, evozierten wir ePSC mittels Nahfeldstimulation und untersuchten die Effekte von Diazepam und Zolpidem auf die gemessenen Ströme. Diazepam und Zolpidem wirken selektiv auf Rezeptoren, die die $\gamma 2$ -Untereinheit enthalten. Wir konnten beobachten, dass 5 von 7 gemessenen NG2-Gliazellen von juvenilen Mäusen Diazepam-sensitiv waren, während in adulten NG2-Gliazellen nur 2 von 9 Zellen sensitiv waren (Chi-Quadrat-Test $p < 0,05$; Figure 3A in Patt et al., 2023). In juvenilen Mäusen waren 4 von 8 Zellen sensitiv gegenüber Zolpidem, hingegen zeigte nur eine von 11 adulten Zellen eine Sensitivität gegenüber Zolpidem (Chi-Quadrat-Test $p < 0,05$; Figure 3B in Patt et al., 2023). Hieraus ergab sich ein deutlicher Hinweis auf eine Veränderung der Zusammensetzung der GABA_A-Rezeptoruntereinheiten während der postnatalen Entwicklung im Sinne einer Herabregulation der $\gamma 2$ -Untereinheit. Interessanterweise beobachteten wir, anders als bei sPSC und mPSC, eine Verlangsamung von Rise Time (median p10: 1,28 ms, p60: 4,74 ms, $p < 0,001$) und Decay Time (median p10: 40,56 ms, p60: 57,36 ms, $p < 0,01$) in NG2-Gliazellen adulter Mäuse (Figure 3C,D in Patt et al., 2023). Dies könnte ein Hinweis auf eine vermehrte Aktivierung extrasynaptischer GABA_A-Rezeptoren in NG2-Gliazellen adulter Mäuse sein.

Funktionelle Analysen der extrasynaptischen GABAergen Signalübertragung in NG2-Gliazellen während der Entwicklung

Diese Vermutung wurde unterstützt durch Messung von ePSC (Niedrigfrequenz-Einzelpuls-Stimulation) unter Blockade der GABA-Transporter Typ 1 (GAT-1, präsent in präsynaptischen Neuronen) und Typ 3 (GAT-3, vor allem in Astrozyten) mit NNC-711 und

SNAP-5114. Diese Transporter regulieren die extrasynaptische Konzentration von GABA (Kersanté et al., 2013). Durch ihre Inhibition erhöht sich die extrasynaptische Konzentration von GABA, sodass, wenn extrasynaptische Rezeptoren an den gemessenen Strömen beteiligt sind, ein stärkerer Effekt auf die kinetischen Eigenschaften zu erwarten ist. Es zeigte sich, dass in juvenilen NG2-Gliazellen weder NNC-711 noch SNAP-5114 einen Einfluss auf die kinetischen Eigenschaften der ePSC hatten. Hingegen verlängerte sich die Decay Time in adulten NG2-Gliazellen unter Einfluss von NNC-711 und SNAP-5114 ($p < 0,001$ und $p < 0,01$), wobei der Effekt von NNC-711 ausgeprägter war ($p < 0,01$; Figure 4 in Patt et al., 2023).

Zudem untersuchten wir die Eigenschaften von tonischen GABA_A-Rezeptor-abhängigen Strömen. Da diese Ströme sehr klein sind, wuschen wir zunächst den GABA-Transporter-Inhibitor Nipicotinsäure (1mM) über mindestens 3 min ein, sodass sich die extrasynaptische GABA-Konzentration erhöhen konnte. Durch Addition von Bicucullin (20 μ M), einem kompetitiven GABA_A-Rezeptorantagonist, wurden die tonischen GABA_A-Rezeptor-abhängigen Ströme blockiert, sodass sich eine Verschiebung des Haltestroms beobachten ließ. Diese Verschiebung entspricht der Amplitude des tonischen Stroms. Tonische Ströme waren sowohl in juvenilen als auch in adulten NG2-Zellen nachweisbar. Es gab keinen Unterschied in der Amplitude zwischen den beiden Altersgruppen (arithmetisches Mittel \pm Standardabweichung p10: $13,72 \pm 17,61$ pA, p60: $14,15 \pm 11,14$ pA, $p = 0,09$; Figure 5A,B in Patt et al., 2023). Zudem nutzen wir den $\alpha 5$ -Untereinheit-spezifischen Inhibitor $\alpha 5$ IA, um pharmakologisch die Anwesenheit der hauptsächlich extrasynaptisch exprimierten $\alpha 5$ -Untereinheit zu untersuchen. Hierzu applizierten wir, nach Anreicherung von GABA im extrasynaptischen Raum mit Hilfe von Nipicotinsäure, wie zuvor beschrieben, zunächst $\alpha 5$ IA (0,5 mM) und 2 min später Bicucullin (20 μ M). Hierdurch beobachteten wir eine zweistufige Verschiebung des Haltestroms, zunächst durch eine teilweise Blockade des tonischen Stroms durch Inhibition $\alpha 5$ -Untereinheit-enthaltender Rezeptoren und anschließend vollständiger Blockade des tonischen Stroms durch Bicucullin. Durch Vergleich der Verschiebung des Haltestroms nach Zugabe von $\alpha 5$ IA mit der Verschiebung, die durch Bicucullin ausgelöst wurde, ergab sich der relative Effekt von $\alpha 5$ IA. Dieser gibt einen Hinweis darauf, wie groß der Anteil an GABA_A-Rezeptoren mit $\alpha 5$ -Untereinheit am tonischen Strom war. In adulten Mäusen zeigte sich ein höherer relativer Effekt von $\alpha 5$ IA auf den Haltestrom als in juvenilen Mäusen

(arithmetisches Mittel \pm Standardabweichung p10: $0,18 \pm 0,2$, p60: $0,4 \pm 0,18$, $p < 0,05$; Figure 5C,D in Patt et al., 2023). Somit weisen die Ergebnisse auf eine Hochregulation der Expression der $\alpha 5$ -Untereinheit während der postnatalen Entwicklung hin.

Molekulare Analysen der Expression von GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten während der Entwicklung

Pharmakologisch konnten wir Hinweise auf eine Herabregulation der $\gamma 2$ -Untereinheit und eine Hochregulation der $\alpha 5$ -Untereinheit in NG2-Gliazellen adulter Mäuse im Vergleich zu denen juveniler Mäuse feststellen.

Um diese funktionellen Veränderungen mit molekularen Veränderungen zu korrelieren, analysierten wir die Expression von GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten mittels Einzelzell-RT-PCR, zur Differenzierung von $\beta 2$ und $\beta 3$ kam zudem eine Restriktionsanalyse zum Einsatz. Genutzt wurden einzelne NG2-Gliazellen aus der CA1-Region des Hippokampus von adulten Mäusen, die zuvor mittels Patch-Clamp-Technik elektrophysiologisch charakterisiert wurden. Diese Daten verglichen wir mit den bereits zuvor von Passlick et al. (2013) publizierten Daten zur Expression von GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten bei juvenilen Mäusen. Hierbei konnten wir in adulten NG2-Gliazellen eine erhöhte Expression der Untereinheiten $\alpha 3$ (p10: $0,3$, p60: $0,56$, $p < 0,05$) und $\alpha 5$ (p10: $0,15$, p60: $0,88$, $p < 0,001$) nachweisen. Zudem zeigte sich in adulten Mäusen eine verminderte Expression der $\beta 3$ - (p10: $0,95$, p60: $0,6$, $p < 0,01$) und $\gamma 2$ -Untereinheiten (p10: $0,64$, p60: $0,19$, $p < 0,01$; Figure 6 in Patt et al., 2023).

Um die entwicklungsabhängigen Veränderungen in der Expression, insbesondere der $\alpha 5$ - und $\gamma 2$ -Untereinheiten, weiterführend zu untersuchen, ergänzten wir Analysen der GABA_A-Rezeptoruntereinheiten durch semiquantitative Real-Time RT-PCR aus FACS-sortierten NG2-Gliazellpools aus dem Hippokampus juveniler und adulter Mäuse. Hierbei ergaben sich die in Abbildung 1 dargestellten mRNA-Expressionslevel. Es konnte erneut eine signifikante Reduktion der Expression der $\gamma 2$ -Untereinheit nachgewiesen werden, im mRNA-Expressionslevel der $\alpha 5$ -Untereinheit zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Altersgruppen. Bei der Interpretation der Ergebnisse ist jedoch auch zu bedenken, dass die analysierten NG2-Gliazellen für die Einzelzell-RT-PCR nur aus der CA1-Region des Stratum radiatum des Hippokampus isoliert wurden, während

für die FACS-Analyse und semiquantitative Real-Time RT-PCR der gesamte Hippokampus präpariert wurde.

Zusammenfassend ließen sich in den molekularen Analysen Veränderungen in der Expression der GABA_A-Rezeptoruntereinheiten im Verlauf der postnatalen Entwicklung nachweisen, die mit den nachgewiesenen funktionellen Veränderungen korrelieren. Insbesondere die pharmakologischen Hinweise auf eine Herabregulation der Expression der γ 2-Untereinheit und auf eine Hochregulation der Expression der α 5-Untereinheit während der postnatalen Entwicklung werden durch die Ergebnisse der Einzelzell-RT-PCR unterstützt.

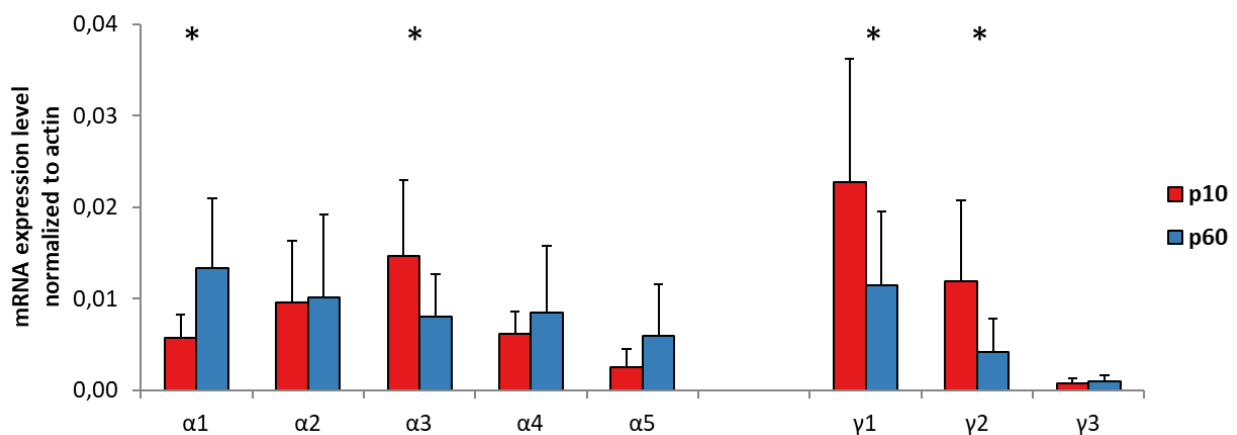


Abb. 1 Semiquantitative Real-Time RT-PCR von FACS-sortierten NG2-Gliazellen aus dem Hippokampus juveniler und adulter Mäuse

Das mRNA-Expressionslevel der α 1-Untereinheit war in Zellpools adulter Mäuse höher als in Zellpools juveniler Mäuse (p10: 0,006 ± 0,002, p60: 0,013 ± 0,008, $p < 0,01$). Hingegen zeigte sich für die α 3- (p10: 0,015 ± 0,008, p60: 0,008 ± 0,005, $p < 0,05$), γ 1- (p10: 0,023 ± 0,013, p60: 0,012 ± 0,008, $p < 0,05$), und γ 2-Untereinheiten (p10: 0,012 ± 0,009, p60: 0,004 ± 0,004, $p < 0,05$, Patt et. al., 2023) eine Verringerung des Expressionslevels im Alter p60 im Vergleich zu p10. Die mRNA-Expressionslevel der α 5-Untereinheit zeigten keine Unterschiede zwischen den Altersgruppen (p10: 0,003 ± 0,002, p60: 0,006 ± 0,006, $p = 0,27$, Patt et. al., 2023). Die Daten sind als arithmetisches Mittel ± Standardabweichung angegeben. Die Signifikanzprüfung erfolgte mittels t-Test.

Expression und subzelluläre Lokalisation von Gerüstproteinen der postsynaptischen und extrasynaptischen GABA_A-Rezeptorverankerung und -gruppierung

Die Mechanismen der Rezeptorverankerung an der Postsynapse und an extrasynaptischen Membranen sind in NG2-Gliazellen bisher nicht bekannt. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zur neuronalen Postsynapse stellte sich die Frage ob die gleichen

Gerüstproteine auch für die Rezeptorverankerung in NG2-Gliazellen eine Rolle spielen, nachdem die Expression von Neuroligin-2 in NG2-Gliazellen bereits nachgewiesen werden konnte (Passlick et al., 2016). In Anbetracht der beobachteten Veränderung der GABAergen Signaltransduktion von Interneuronen auf NG2-Gliazellen von synaptischer Signalübertragung zu extrasynaptischer Signalübertragung im Laufe der postnatalen Entwicklung sowie der Veränderungen der Expression von GABA_A-Rezeptoruntereinheiten stellte sich zudem die Frage, ob auch in der Expression der Gerüstproteine eine Veränderung zu beobachten ist.

Hierzu konnten wir zunächst die Expression von Gephyrin, Collybistin und GARLH4, die in Neuronen zusammen mit Neuroligin-2 relevante postsynaptische Gerüstproteine sind, und Radixin, welches in Neuronen in Interaktion mit der $\alpha 5$ -Untereinheit der extrasynaptischen Rezeptorverankerung dient, mittels Einzelzell-RT-PCR in juvenilen und adulten NG2-Gliazellen nachweisen. Hierbei zeigte sich kein Unterschied in der Expression der Gerüstproteine zwischen den beiden Altersgruppen. Wir ergänzten zudem semiquantitative Real-Time RT-PCR aus FACS-sortierten NG2-Gliazellpools des Hippokampus juveniler und adulter Mäuse für Radixin, da sich in den funktionellen und molekularen Analysen eine Hochregulation der $\alpha 5$ -Untereinheit in adulten NG2-Gliazellen gezeigt hatte. Für Radixin zeigte sich auch hier kein Unterschied zwischen den Altersgruppen. Somit werden Gephyrin, Collybistin, GARLH4 und Radixin in hippokampalen NG2-Gliazellen beider Altersgruppen exprimiert und dienen vermutlich, ähnlich wie in Neuronen, der Rezeptorverankerung und -gruppierung an der Postsynapse beziehungsweise, im Falle von Radixin, der extrasynaptischen Verankerung (Figure 7 in Patt et al., 2023).

Es stellte sich weiterhin die Frage der subzellulären Lokalisation der Gerüstproteine. Daher wendeten wir in Hirnschnitten adulter Mäuse eine immunzytochemische Dreifach-Färbung von Radixin (extrasynaptische Cluster), Gephyrin (postsynaptische Cluster) und GFP/EYFP (Identifikation der NG2-Gliazellen) mit Expansionsmikroskopie an. Hierbei konnten wir Gephyrin- und Radixin-positive Proteincluster in NG2-Gliazellen nachweisen. Diese waren hauptsächlich an der Zellmembran des Somas und den Fortsätzen der NG2-Gliazellen nachweisbar, Gephyrin jedoch auch im Zytoplasma. Hierbei zeigte sich nur selten eine Co-Lokalisation von Gephyrin und Radixin (Figure 8 in Patt et al., 2023).

Ergänzend führten wir die Färbung mit Thy1-GFP-postiven Mäusen durch, um die Verteilung in Pyramidenneuronen zu vergleichen. Es zeigte sich ein ähnliches Verteilungsmuster, was nahelegt, dass die Gerüstproteine in NG2-Gliazellen, ähnlich wie in Neuronen, der Bildung von postsynaptischen, im Falle von Gephyrin, und extrasynaptischen, im Falle von Radixin, Proteinclustern dienen (Figure 9 in Patt et al., 2023).

1.4 Diskussion

Reduktion der synaptischen GABAergen Signaltransduktion und einhergehende Veränderungen in NG2-Gliazellen während der postnatalen Entwicklung

Wir konnten in der CA1-Region des Hippokampus eine entwicklungsabhängige Reduktion der durch GABA_A-Rezeptoren vermittelten synaptischen Signalübertragung feststellen. Dies äußert sich in einer reduzierten Frequenz von sPSC und mPSC in adulten Mäusen, was entwicklungsbedingten Veränderungen in der glutamatergen Signaltransduktion in NG2-Gliazellen ähnelt (Passlick et al., 2016). Eine ähnliche Reduktion in der synaptischen Übertragung von Interneuronen zu NG2-Gliazellen wurde im Barrel-Kortex beobachtet. In späteren Entwicklungsphasen wurden hier zudem verlangsamte kinetische Eigenschaften von ePSC und eine erhöhte Sensitivität der ePSC-Kinetik auf GAT-1-Inhibitoren beobachtet, weshalb eine Verlagerung von synaptischer zu extrasynaptischer Signaltransduktion, z.B. auch durch einen Spillover-Mechanismus, vermutet wurde (Vélez-Fort et al., 2010). Wir konnten im Hippokampus ebenfalls eine verlängerte Rise Time und Decay Time der ePSC in adulten Mäusen nachweisen. Ebenso verlängerte die Inhibition von GAT-1 und GAT-3 die Decay Time von ePSC in adulten NG2-Gliazellen jedoch nicht in juvenilen, sodass wir ebenfalls Hinweise erhielten auf einen Einfluss eines GABA-Spillover-Mechanismus und eine vermehrte Aktivierung extrasynaptischer GABA_A-Rezeptoren in NG2-Gliazellen adulter Mäuse. Zudem beobachteten wir eine verminderte Sensitivität gegenüber Diazepam und Zolpidem in der Altersgruppe p60, was auf eine verminderte Expression der $\gamma 2$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors hinweist. In Vorstudien konnte gezeigt werden, dass in NG2-Gliazellen des juvenilen Hippokampus postsynaptische GABA_A-Rezeptoren die $\gamma 2$ -Untereinheit enthielten, während sie in

extrasynaptischen Rezeptoren fehlte (Passlick et al., 2013). Demnach würde eine Herabregulation der $\gamma 2$ -Untereinheit zu einer Verlagerung der GABAergen Signaltransduktion von synaptischer zu extrasynaptischer Signalübertragung passen. Diese Herabregulation der Expression der $\gamma 2$ -Untereinheit während der postnatalen Entwicklung konnten wir auch mittels Einzelzell-RT-PCR und semiquantitativer Real-Time RT-PCR bestätigen. Im Barrel-Kortex erfolgt ebenfalls entwicklungsabhängig eine Verminderung der Expression der $\gamma 2$ -Untereinheit (Balía et al., 2015). Die $\gamma 2$ -Untereinheit ist ebenfalls relevant für die Bildung postsynaptischer Rezeptorcluster in Interaktion mit dem Gerüstprotein Gephyrin (Alldred et al., 2005; Essrich et al., 1998; Kneussel und Betz, 2000), sodass eine Reduktion der $\gamma 2$ -Untereinheit Einfluss auf die Bildung postsynaptischer Rezeptorcluster haben kann. Die Dichte von NG2-Gliazellen nimmt während der Entwicklung ab (Moshrefi-Ravasdjani et al., 2017; Timmermann et al., 2023). Durch Deletion der $\gamma 2$ -Untereinheit in juvenilen kortikalen NG2-Gliazellen wurden reduzierte Frequenzen und Amplituden von sPSC beobachtet, während die Ca^{2+} -Signale, Differenzierung und Proliferation der NG2-Gliazellen unverändert blieben. Jedoch wurden Hinweise auf einen Einfluss auf die Feinabstimmung der Selbsterhaltung von NG2-Gliazellen festgestellt (Balía et al., 2017), sodass die physiologische Reduktion von NG2-Gliazellen möglicherweise mit der Reduktion der $\gamma 2$ -Untereinheit in Verbindung stehen könnte. In kortikalen Kulturen wurde jedoch das Gegenteil festgestellt. Hier zeigte sich nach Inhibition von GABA_A-Rezeptoren in OPCs eine erhöhte Anzahl dieser Zellen (Hamilton et al., 2017). In anderen Studien gab es Hinweise auf eine Regulation von Differenzierung und Selbsterhaltung von NG2-Gliazellen durch lokale GABAerge Signale (Mangin et al., 2008; Orduz et al., 2019). Interessanterweise wurde mittels Transkriptomanalyse auch in humanen OPCs eine Reduktion der $\gamma 2$ -Untereinheit in der adulten im Vergleich zu der fetalen und pädiatrischen Gruppe festgestellt (Gutierrez et al., 2023).

Hochregulation der $\alpha 5$ -Untereinheit und einhergehende funktionelle Veränderungen während der Entwicklung

Wir stellten zudem eine erhöhte Expression der $\alpha 5$ -Untereinheit in adulten NG2-Gliazellen fest. Dies spiegelte sich auch funktionell wider, in einer erhöhten Sensitivität gegenüber dem $\alpha 5$ -Untereinheit-spezifischen GABA_A-Rezeptorantagonisten $\alpha 5IA$ sowie

verlangsamten kinetischen Eigenschaften der ePSC in adulten NG2-Gliazellen. Diese Verlangsamung kinetischen Eigenschaften ist charakteristisch für Rezeptoren, die die $\alpha 5$ -Untereinheit enthalten (Burgard, 1996; Capogna und Pearce, 2011). GABA_A-Rezeptoren, die die $\alpha 5$ -Untereinheit enthalten, sind in Neuronen typischerweise extrasynaptisch lokalisiert (Olsen, 2018) und werden durch das Gerüstprotein Radixin am Cytoskelett verankert (Hausrat et al., 2015; Loebrich et al., 2006). In Neuronen vermitteln die extrasynaptischen GABA_A-Rezeptoren tonische Ströme (Caraiscos et al., 2004; Glykys und Mody, 2006, 2007; Glykys et al., 2008; Scimemi et al., 2005). Wir konnten jedoch trotz der erhöhten Expression der $\alpha 5$ -Untereinheit in adulten NG2-Gliazellen keinen Unterschied in den Amplituden der tonischen Ströme feststellen. Interessanterweise wurde im Barrel-Kortex, obwohl auch hier eine Reduktion der $\gamma 2$ -Untereinheit und eine Verlagerung von synaptischer zu extrasynaptischer Signalübertragung beobachtet wurde, eine Herabregulation der Expression der $\alpha 5$ -Untereinheit im Laufe der postnatalen Entwicklung beschrieben (Balía et al., 2015). Während der embryonalen und frühen postnatalen Entwicklung ist die $\alpha 5$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors äußerst gering exprimiert (Patt et al., 2023; Vana et al., 2023).

Expression von Gerüstproteinen und ihre subzelluläre Lokalisation

Aufgrund der GABAergen Innervation von NG2-Gliazellen und der strukturellen Ähnlichkeit der Interneuron-NG2-Gliazell-Synapse zur neuronalen Synapse stellte sich die Frage, ob die Organisation und Verankerung der Rezeptoren in NG2-Gliazellen ähnlichen Mechanismen folgt wie in Neuronen. In Neuronen interagiert an der Postsynapse inhibitorischer Synapsen Gephyrin mit der $\gamma 2$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors (Alldred et al., 2005; Essrich et al., 1998; Kneussel et al., 1999). Hierbei spielt auch GARLH4 als akzessorisches Protein für die Zielbestimmung und Gruppierung der Rezeptoruntereinheiten an der postsynaptischen Membran eine wichtige Rolle (Davenport et al., 2017; Yamasaki et al., 2017). Durch die Interaktion von Gephyrin mit Collybistin, welches an Neuroligin-2 bindet, bilden sich postsynaptische GABA_A-Rezeptorcluster (Papadopoulos und Soykan, 2011; Pouloupoulos et al., 2009). Hingegen dient Radixin in Neuronen der extrasynaptischen Verankerung von GABA_A-Rezeptoren, die die $\alpha 5$ -Untereinheit enthalten (Hausrat et al., 2015; Loebrich et al., 2006). In einer Vorstudie wurde bereits festgestellt, dass NG2-Gliazellen Neuroligin-2 exprimieren

(Passlick et al., 2016). Wir konnten nachweisen, dass zudem Gephyrin, Collybistin und GARLH4 sowie Radixin sowohl in juvenilen als auch adulten NG2-Gliazellen exprimiert werden. Trotz der Veränderungen in der Untereinheitenzusammensetzung – insbesondere der Herabregulation der $\gamma 2$ -Untereinheit und der Hochregulation der $\alpha 5$ -Untereinheit – während der postnatalen Entwicklung konnten wir keine Unterschiede in der Expression der Gerüstproteine zwischen den beiden Altersgruppen feststellen. Mittels Expansionsmikroskopie konnten wir die Bildung von Radixin- und Gephyrin-Clustern nachvollziehen, die denen in Neuronen ähnelten und nur selten co-lokalisiert auftraten, sodass die Gerüstproteine sehr wahrscheinlich eine ähnliche Funktion wie in Neuronen erfüllen. Durch Transkriptomanalyse konnten Gephyrin, Collybistin, Neuroligin-2 und Radixin auch in humanen OPCs detektiert werden (Gutierrez et al., 2023).

1.5 Zusammenfassung

NG2-Gliazellen sind eine Gruppe von Zellen im ZNS, die als einzige nicht-neuronale Zellen in der grauen Substanz synaptischen Input von glutamatergen und GABAergen Neuronen erhalten. Die physiologische Bedeutung der GABAergen Innervation von NG2-Gliazellen ist bislang nicht geklärt. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der durch GABA_A-Rezeptoren vermittelten Signalübertragung von Neuronen zu NG2-Gliazellen im Hippokampus. Im somatosensorischen Kortex konnte ein Wechsel der GABAergen Innervation von NG2-Gliazellen von synaptischer zu extrasynaptischer Signalübertragung im Laufe der postnatalen Entwicklung beobachtet werden, der mit einer Veränderung der Untereinheitenzusammensetzung der GABA_A-Rezeptoren einherging. Ziel dieser Arbeit war herauszufinden, ob ähnliche Veränderungen im Hippokampus während der postnatalen Entwicklung auftreten. Zudem stellte sich die Frage, ob die Organisation und Verankerung von GABA_A-Rezeptoren durch die gleichen Gerüstproteine wie in Neuronen vermittelt werden, was bisher nicht in NG2-Gliazellen untersucht wurde. In Neuronen spielen für postsynaptische Rezeptorcluster insbesondere Gephyrin (Interaktion mit der $\gamma 2$ -Untereinheit), Collybistin, Neuroligin-2 (Expression in NG2-Gliazellen beschrieben) und GARLH4 eine Rolle. Die Verankerung von extrasynaptischen Rezeptoren am Cytoskelett wird in Neuronen durch Radixin in Interaktion mit der $\alpha 5$ -Untereinheit

vermittelt. Durch elektrophysiologische Untersuchungen in akuten hippocampalen Hirnschnitten adulter und juveniler Mäuse konnten wir zeigen, dass die synaptische Übertragung von Interneuronen zu NG2-Gliazellen während der Entwicklung abnimmt. Durch pharmakologische Analysen konnten wir bei adulten NG2-Gliazellen eine verminderte Sensitivität für Diazepam und Zolpidem ($\gamma 2$ -Untereinheit-spezifische GABA_A-Rezeptormodulatoren), was auf eine Herunterregulation der Expression der $\gamma 2$ -Untereinheit hinweist, sowie verlangsamte kinetische Eigenschaften der evozierten Ströme beobachten. Diese könnten auf eine vermehrte Vermittlung phasischer Rezeptorantworten durch extrasynaptische GABA_A-Rezeptoren zurückzuführen sein, was eine erhöhte Sensitivität der kinetischen Eigenschaften auf Inhibitoren der GABA-Transporter GAT-1 und GAT-3 in adulten Zellen bestärkte. Extrasynaptische GABA_A-Rezeptoren in NG2-Gliazellen vermitteln zusätzlich tonische Ströme. Diese waren in beiden Altersgruppen gleichermaßen nachweisbar. Hierbei lag in adulten NG2-Gliazellen eine erhöhte Sensitivität der tonischen Ströme für den $\alpha 5$ -Untereinheit-spezifischen Inhibitor $\alpha 5$ IA vor, was für eine vermehrte Expression dieser Untereinheit in adulten Zellen spricht. Diese Beobachtungen konnten wir durch molekulargenetische Analysen unterstützen. Hierbei zeigte sich eine reduzierte Expression der $\gamma 2$ -Untereinheit und eine Hochregulation der Expression der $\alpha 5$ -Untereinheit in adulten NG2-Gliazellen. Zusammenfassend sprechen diese Daten für einen Wechsel von synaptischer zu extrasynaptischer Signalübertragung von Interneuronen zu NG2-Gliazellen während der postnatalen Entwicklung im Hippokampus, wobei, anders als im somatosensorischen Kortex, neben der Reduktion der $\gamma 2$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors auch eine vermehrte Expression der $\alpha 5$ -Untereinheit eine Rolle spielt. Zudem konnten wir nachweisen, dass die Gerüstproteine Gephyrin, Collybistin, GARLH4 und Radixin sowohl in juvenilen als auch adulten NG2-Gliazellen ohne entwicklungsabhängige Unterschiede exprimiert werden. Mittels Expansionsmikroskopie konnten wir die Bildung von Radixin- und Gephyrin-Clustern nachweisen, die denen in Neuronen ähnelten und nur selten colokalisiert auftraten, sodass die Gerüstproteine sehr wahrscheinlich eine ähnliche Funktion wie in Neuronen erfüllen.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Allred MJ, Mulder-Rosi J, Lingenfelter SE, Chen G, Lüscher B. Distinct gamma2 subunit domains mediate clustering and synaptic function of postsynaptic GABAA receptors and gephyrin. *J Neurosci* 2005; 25: 594–603

Arellano RO, Sánchez-Gómez MV, Alberdi E, Canedo-Antelo M, Chara JC, Palomino A, Pérez-Samartín A, Matute C. Axon-to-Glia Interaction Regulates GABAA Receptor Expression in Oligodendrocytes. *Mol Pharmacol* 2016; 89: 63–74

Asano SM, Gao R, Wassie AT, Tillberg PW, Chen F, Boyden ES. Expansion Microscopy: Protocols for Imaging Proteins and RNA in Cells and Tissues. *Curr Protoc Cell Biol* 2018; 80: e56

Balia M, Benamer N, Angulo MC. A specific GABAergic synapse onto oligodendrocyte precursors does not regulate cortical oligodendrogenesis. *Glia* 2017; 65: 1821–1832

Balia M, Vélez-Fort M, Passlick S, Schäfer C, Audinat E, Steinhäuser C, Seifert G, Angulo MC. Postnatal down-regulation of the GABAA receptor γ 2 subunit in neocortical NG2 cells accompanies synaptic-to-extrasynaptic switch in the GABAergic transmission mode. *Cereb Cortex* 2015; 25: 1114–1123

Bergles DE, Jabs R, Steinhäuser C. Neuron-glia synapses in the brain. *Brain Res Rev* 2010; 63: 130–137

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

Burgard. Properties of recombinant gamma-aminobutyric acid A receptor isoforms containing the alpha 5 subunit subtype. *Mol Pharmacol* 1996; 50: 119

Capogna M, Pearce RA. GABA A_{slow}: causes and consequences. *Trends Neurosci* 2011; 34: 101–112

Caraiscos VB, Elliott EM, You-Ten KE, Cheng VY, Belelli D, Newell JG, Jackson MF, Lambert JJ, Rosahl TW, Wafford KA, MacDonald JF, Orser BA. Tonic inhibition in mouse hippocampal CA1 pyramidal neurons is mediated by alpha5 subunit-containing gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 3662–3667

Davenport EC, Pendolino V, Kontou G, McGee TP, Sheehan DF, López-Doménech G, Farrant M, Kittler JT. An Essential Role for the Tetraspanin LHFPL4 in the Cell-Type-Specific Targeting and Clustering of Synaptic GABAA Receptors. *Cell Rep* 2017; 21: 70–83

Degen J, Dublin P, Zhang J, Dobrowolski R, Jokwitz M, Karram K, Trotter J, Jabs R, Willecke K, Steinhäuser C, Theis M. Dual reporter approaches for identification of Cre efficacy and astrocyte heterogeneity. *FASEB J* 2012; 26: 4576–4583

Deshpande T, Li T, Herde MK, Becker A, Vatter H, Schwarz MK, Henneberger C, Steinhäuser C, Bedner P. Subcellular reorganization and altered phosphorylation of the astrocytic gap junction protein connexin43 in human and experimental temporal lobe epilepsy. *Glia* 2017; 65: 1809–1820

Dimou L, Simon C, Kirchhoff F, Takebayashi H, Götz M. Progeny of Olig2-expressing progenitors in the gray and white matter of the adult mouse cerebral cortex. *J Neurosci* 2008; 28: 10434–10442

Essrich C, Lorez M, Benson JA, Fritschy JM, Lüscher B. Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nat Neurosci* 1998; 1: 563–571

Garaschuk O, Hanse E, Konnerth A. Developmental profile and synaptic origin of early network oscillations in the CA1 region of rat neonatal hippocampus. *J Physiol* 1998; 507 (Pt 1): 219–236

Glykys J, Mann EO, Mody I. Which GABA(A) receptor subunits are necessary for tonic inhibition in the hippocampus? *J Neurosci* 2008; 28: 1421–1426

Glykys J, Mody I. Hippocampal network hyperactivity after selective reduction of tonic inhibition in GABA A receptor alpha5 subunit-deficient mice. *J Neurophysiol* 2006; 95: 2796–2807

Glykys J, Mody I. The main source of ambient GABA responsible for tonic inhibition in the mouse hippocampus. *J Physiol* 2007; 582: 1163–1178

Gutierrez BA, González-Coronel JM, Arellano RO, Limon A. Transcriptional and bioinformatic analysis of GABAA receptors expressed in oligodendrocyte progenitor cells from the human brain. *Front Mol Neurosci* 2023; 16: 1279232

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 Ca²⁺-signaling pathways and highly motile processes. *PLoS One* 2011; 6: e17575

Hamilton NB, Clarke LE, Arancibia-Carcamo IL, Kougioumtzidou E, Matthey M, Káradóttir R, Whiteley L, Bergersen LH, Richardson WD, Attwell D. Endogenous GABA controls oligodendrocyte lineage cell number, myelination, and CNS internode length. *Glia* 2017; 65: 309–321

Hausrat TJ, Muhia M, Gerrow K, Thomas P, Hirdes W, Tsukita S, Heisler FF, Herich L, Dubroqua S, Breiden P, Feldon J, Schwarz JR, Yee BK, Smart TG, Triller A, Kneussel M. Radixin regulates synaptic GABAA receptor density and is essential for reversal learning and short-term memory. *Nat Commun* 2015; 6: 6872

Herde MK, Bohmbach K, Domingos C, Vana N, Komorowska-Müller JA, Passlick S, Schwarz I, Jackson CJ, Dietrich D, Schwarz MK, Henneberger C. Local Efficacy of Glutamate Uptake Decreases with Synapse Size. *Cell Rep* 2020; 32: 108182

Hevers W, Lüddens H. The diversity of GABAA receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABAA channel subtypes. *Mol Neurobiol* 1998; 18: 35–86

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

Kang SH, Fukaya M, Yang JK, Rothstein JD, Bergles DE. NG2⁺ CNS glial progenitors remain committed to the oligodendrocyte lineage in postnatal life and following neurodegeneration. *Neuron* 2010; 68: 668–681

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

- Kersanté F, Rowley SCS, Pavlov I, Gutiérrez-Mecinas M, Semyanov A, Reul, Johannes M. H. M., Walker MC, Linthorst ACE. A functional role for both -aminobutyric acid (GABA) transporter-1 and GABA transporter-3 in the modulation of extracellular GABA and GABAergic tonic conductances in the rat hippocampus. *J Physiol* 2013; 591: 2429–2441
- Kneussel M, Betz H. Clustering of inhibitory neurotransmitter receptors at developing postsynaptic sites: the membrane activation model. *Trend Neurosci* 2000; 23: 429–435
- Kneussel M, Brandstätter JH, Laube B, Stahl S, Müller U, Betz H. Loss of postsynaptic GABA(A) receptor clustering in gephyrin-deficient mice. *J Neurosci* 1999; 19: 9289–9297
- Lin S, Bergles DE. Synaptic signaling between GABAergic interneurons and oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nat Neurosci* 2004; 7: 24–32
- Loebrich S, Bähring R, Katsuno T, Tsukita S, Kneussel M. Activated radixin is essential for GABA_A receptor alpha5 subunit anchoring at the actin cytoskeleton. *EMBO J* 2006; 25: 987–999
- 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
- Mehta AK, Ticku MK. An update on GABA_A receptors. *Brain Res Brain Res Rev* 1999; 29: 196–217
- 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
- Olsen RW. GABA_A receptor: Positive and negative allosteric modulators. *Neuropharmacology* 2018; 136: 10–22

Olsen RW, Sieghart W. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacol Rev* 2008; 60: 243–260

Olsen RW, Sieghart W. GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology* 2009; 56: 141–148

Orduz D, Benamer N, Ortolani D, Coppola E, Vigier L, Pierani A, Angulo MC. Developmental cell death regulates lineage-related interneuron-oligodendroglia functional clusters and oligodendrocyte homeostasis. *Nat Commun* 2019; 10: 4249

Papadopoulos T, Soykan T. The role of collybistin in gephyrin clustering at inhibitory synapses: facts and open questions. *Front Cell Neurosci* 2011; 5: 11

Passlick S, Grauer M, Schäfer C, Jabs R, Seifert G, Steinhäuser C. Expression of the γ 2-subunit distinguishes synaptic and extrasynaptic GABA(A) receptors in NG2 cells of the hippocampus. *J Neurosci* 2013; 33: 12030–12040

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

Patt L, Tascio D, Domingos C, Timmermann A, Jabs R, Henneberger C, Steinhäuser C, Seifert G. Impact of Developmental Changes of GABAA Receptors on Interneuron-NG2 Glia Transmission in the Hippocampus. *Int J Mol Sci* 2023; 24

Poulopoulos A, Aramuni G, Meyer G, Soykan T, Hoon M, Papadopoulos T, Zhang M, Paarmann I, Fuchs C, Harvey K, Jedlicka P, Schwarzacher SW, Betz H, Harvey RJ, Brose N, Zhang W, Varoqueaux F. Neuroligin 2 drives postsynaptic assembly at perisomatic inhibitory synapses through gephyrin and collybistin. *Neuron* 2009; 63: 628–642

Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M, Kaila K. The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 1999; 397: 251–255

Scimemi A, Semyanov A, Sperk G, Kullmann DM, Walker MC. Multiple and plastic receptors mediate tonic GABAA receptor currents in the hippocampus. *J Neurosci* 2005; 25: 10016–10024

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

Seifert G, Sommer E, Passlick S, Henneberger C. Super-resolution Analysis of Astrocyte Morphology Using Expansion Microscopy. *Methods Mol Biol* 2025; 2896: 165–179

Stein V, Hermans-Borgmeyer I, Jentsch TJ, Hübner CA. Expression of the KCl cotransporter KCC2 parallels neuronal maturation and the emergence of low intracellular chloride. *J Comp Neurol* 2004; 468: 57–64

Tanaka Y, Tozuka Y, Takata T, Shimazu N, Matsumura N, Ohta A, Hisatsune T. Excitatory GABAergic activation of cortical dividing glial cells. *Cereb Cortex* 2009; 19: 2181–2195

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

Vana NS, van Loo KMJ, van Waardenberg AJ, Tießen M, Cases-Cunillera S, Sun W, Quatraccioni A, Schoch S, Dietrich D. Early cortical oligodendrocyte precursor cells are transcriptionally distinct and lack synaptic connections. *Glia* 2023; 71: 2210–2233

Vélez-Fort M, Maldonado PP, Butt AM, Audinat E, Angulo MC. Postnatal switch from synaptic to extrasynaptic transmission between interneurons and NG2 cells. *J Neurosci* 2010; 30: 6921–6929

Yamasaki T, Hoyos-Ramirez E, Martenson JS, Morimoto-Tomita M, Tomita S. GARLH Family Proteins Stabilize GABA_A Receptors at Synapses. *Neuron* 2017; 93: 1138–1152.e6

2. Veröffentlichung

Dieser Publikationsdissertation liegt die folgende, unabhängig begutachtete Veröffentlichung zugrunde:

Patt L, Tascio D, Domingos C, Timmermann A, Jabs R, Henneberger C, Steinhäuser C, Seifert G. Impact of Developmental Changes of GABAA Receptors on Interneuron-NG2 Glia Transmission in the Hippocampus. Int J Mol Sci 2023; 24

<https://doi.org/10.3390/ijms241713490>

3. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Institut für Zelluläre Neurowissenschaften unter Betreuung von Prof. Dr. Christian Steinhäuser durchgeführt.

Die Konzeption der Arbeit erfolgte durch Prof. Dr. Christian Steinhäuser und Dr. Gerald Seifert.

Die Durchführung und Auswertung sämtlicher elektrophysiologischer Versuche, bis auf die Versuche bzgl. des Effektes von GAT-1 und GAT-3-Inhibitoren auf ePSC, wurden von mir durchgeführt, nach Einarbeitung und unter fachlicher Beratung durch Prof. Dr. Christian Steinhäuser, Dr. Gerald Seifert und Dr. Ronald Jabs. Die elektrophysiologischen Versuche bzgl. des Effekts von GAT-1 und GAT-3-Inhibitoren auf ePSC wurden von Dr. Dario Tascio durchgeführt und ausgewertet.

Die Materialgewinnung und elektrophysiologische Charakterisierung der NG2-Gliazellen für die Einzelzell-RT-PCR erfolgte durch mich. Die Durchführung der Einzelzell-RT-PCR sowie die FACS-Sortierung und semiquantitative Real-Time-RT-PCR erfolgte durch Dr. Gerald Seifert. Die Auswertung der Ergebnisse der Einzelzell-RT-PCR und der semiquantitativen Real-Time-RT-PCR führten Dr. Gerald Seifert und ich gemeinsam durch.

Die immunzytochemischen Färbungen und die Expansionsmikroskopie wurden mit Beratung durch Prof. Dr. Christian Henneberger und Cátia Domingos konzipiert. Die Durchführung erfolgte durch mich unter Anleitung von Dr. Aline Timmermann und Cátia Domingos. Die Akquirierung und Auswertung der Bilddaten erfolgte durch Cátia Domingos.

Die statistische Auswertung und Interpretation der Daten führte ich eigenständig nach Beratung durch Prof. Dr. Christian Steinhäuser, Dr. Gerald Seifert und Dr. Ronald Jabs durch.

Ich versichere, die Dissertationsschrift selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

4. Danksagung

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

Insbesondere danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Christian Steinhäuser für die Überlassung dieses interessanten Projektes, die ausgezeichneten Möglichkeiten zur Bearbeitung der Fragestellung sowie die wertvolle und geduldige Unterstützung während der gesamten Promotion.

Mein besonderer Dank gilt auch meinem Betreuer Dr. Gerald Seifert, der mir mit seinem umfassenden Fachwissen für jede Frage zur Verfügung stand, mich stets freundlich und tatkräftig unterstützt hat und immer für ein gutes Gespräch bei einer Tasse Tee zu haben war.

Desweiteren bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Zelluläre Neurowissenschaften für die Hilfsbereitschaft, das immer wertvolle Feedback und die tolle Arbeitsatmosphäre. Vielen Dank an Dr. Ronald Jabs, der stets für jegliche Frage zur Elektrophysiologie und bezüglich technischer Probleme oder Statistik eine Lösung beisteuern konnte, an Dr. Aline Timmermann für die ausgezeichnete Einarbeitung und Hilfe bei den Experimenten und deren Auswertung und an Dr. Dario Tascio für die Fertigstellung der letzten Experimente vor der Veröffentlichung. Besten Dank an Prof. Dr. Christian Henneberger und Cátia Domingos für die tatkräftige Unterstützung bei der Planung und Umsetzung der Expansionsmikroskopie. Ich bedanke mich auch bei Thomas Erdmann für die technische Unterstützung und bei Dr. Silke Künzel für die Hilfe bei allen organisatorischen Angelegenheiten.

Ich bedanke mich auch bei BONFOR für die finanzielle Unterstützung meines Forschungsvorhabens, die mir ermöglichte mich ein Jahr auf die Laborarbeit zu konzentrieren.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden für ihren Rückhalt und ihre unerschöpfliche Unterstützung. Von Herzen danke ich Fabian Patt-Peckmann dafür, dass er mir stets mit viel Verständnis, unerschütterlicher Ermutigung und liebevoller Unterstützung zur Seite steht.

5. Publikation (PDF-Version)



Article

Impact of Developmental Changes of GABA_A Receptors on Interneuron-NG2 Glia Transmission in the Hippocampus

Linda Patt ¹, Dario Tascio ¹, Catia Domingos ¹, Aline Timmermann ¹, Ronald Jabs ¹, Christian Henneberger ^{1,2}, Christian Steinhäuser ^{1,*} and Gerald Seifert ^{1,*}

¹ Institute of Cellular Neurosciences, Medical Faculty, University of Bonn, 53127 Bonn, Germany; linda.patt@ukbonn.de (L.P.); dario.tascio@ukbonn.de (D.T.); ciafonsodomingos@gmail.com (C.D.); aline.timmermann@web.de (A.T.); ronald.jabs@ukbonn.de (R.J.); christian.henneberger@uni-bonn.de (C.H.)
² German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), 53127 Bonn, Germany
* Correspondence: christian.steinhaeuser@ukbonn.de (C.S.); gerald.seifert@ukbonn.de (G.S.); Tel.: +49-228-28714669 (C.S.); +49-228-28719781 (G.S.)

Abstract: NG2 glia receive synaptic input from neurons, but the functional impact of this glial innervation is not well understood. In the developing cerebellum and somatosensory cortex the GABAergic input might regulate NG2 glia differentiation and myelination, and a switch from synaptic to extrasynaptic neuron–glia signaling was reported in the latter region. Myelination in the hippocampus is sparse, and most NG2 glia retain their phenotype throughout adulthood, raising the question of the properties and function of neuron-NG2 glia synapses in that brain region. Here, we compared spontaneous and evoked GABA_A receptor-mediated currents of NG2 glia in juvenile and adult hippocampi of mice of either sex and assessed the mode of interneuron–glial signaling changes during development. With patch-clamp and pharmacological analyses, we found a decrease in innervation of hippocampal NG2 glia between postnatal days 10 and 60. At the adult stage, enhanced activation of extrasynaptic receptors occurred, indicating a spillover of GABA. This switch from synaptic to extrasynaptic receptor activation was accompanied by downregulation of $\gamma 2$ and upregulation of the $\alpha 5$ subunit. Molecular analyses and high-resolution expansion microscopy revealed mechanisms of glial GABA_A receptor trafficking and clustering. We found that gephyrin and radixin are organized in separate clusters along glial processes. Surprisingly, the developmental loss of $\gamma 2$ and postsynaptic receptors were not accompanied by altered glial expression of scaffolding proteins, auxiliary receptor subunits or postsynaptic interaction proteins. The GABAergic input to NG2 glia might contribute to the release of neurotrophic factors from these cells and influence neuronal synaptic plasticity.

Keywords: NG2 glia; GABA_A receptors; postnatal development; hippocampus; neuron–glia interaction; extrasynaptic receptors; gephyrin; radixin; expansion microscopy



Citation: Patt, L.; Tascio, D.; Domingos, C.; Timmermann, A.; Jabs, R.; Henneberger, C.; Steinhäuser, C.; Seifert, G. Impact of Developmental Changes of GABA_A Receptors on Interneuron-NG2 Glia Transmission in the Hippocampus. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 13490. <https://doi.org/10.3390/ijms241713490>

Academic Editor: Alexandre Hiroaki Kihara

Received: 22 June 2023

Revised: 11 August 2023

Accepted: 29 August 2023

Published: 30 August 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. 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/>).

1. Introduction

NG2 glia represent the largest population of proliferative cells in the postnatal brain outside the neurogenic niches. In white matter, the majority of these cells differentiate into oligodendrocytes and are therefore also named oligodendrocyte progenitor cells or OPCs [1]. In contrast, in the hippocampus and other gray matter regions, most of these cells do not become oligodendrocytes but maintain their NG2 phenotype throughout adulthood [2,3]. NG2 glia specifically express the proteoglycan NG2 (also termed CSPG4) and PDGFR α [4], which helps identifying these cells. They are ubiquitously distributed throughout the brain, with the cell density of astrocytes exceeding that of NG2 glia by up to 16 fold, depending on the brain region [5]. In the hippocampus, they form a relatively homogeneous population with regard to their shape, orientation and distribution across the different strata [6]. NG2 glia are equipped with functional AMPA and GABA_A receptors

and receive direct synaptic input from glutamatergic and GABAergic neurons [7–9], but the impact of synaptic innervation of NG2 glia is not well understood.

GABA_A receptors are ionotropic receptors forming pentamers composed of 2 α , 2 β and 1 γ subunits. Furthermore, 16 different GABA_A receptor subunits are known (6 α , 3 β , 3 γ , δ , ϵ , π , θ), forming subunit combinations with distinct pharmacological properties. Pharmacological evidence of cell-specific subunit composition is derived from modulators acting on allosteric binding sites for benzodiazepine, barbiturate, zinc and volatile anesthetics (reviewed by [10–12]). The receptors form a Cl[−]- and HCO₃[−]-permeable channel. In adult neurons, GABA_A receptor opening leads to hyperpolarization, while in the immature brain, the Cl[−] equilibrium potential is more positive and GABA depolarizes the membrane [13]. In rodents, this developmental switch occurs during the first two postnatal weeks and is due to increasing expression of the KCl co-transporter KCC2 [14,15]. Oligodendrocytes and NG2 glia lack KCC2, and therefore, GABA_A receptor opening entails depolarization [16–18].

Previously, we have shown that at the juvenile stage, receptor responses of NG2 glia are potentiated by allosteric modulators interacting with the benzodiazepine and barbiturate binding sites. GABA-mediated currents were also potentiated by zolpidem, which binds at the α/γ 2-benzodiazepine site. On a subcellular level, the γ 2 subunit is located postsynaptically in NG2 glia while tonic currents are mediated by zolpidem-insensitive, extrasynaptic receptors lacking γ 2 [17,19]. A developmental switch from synaptic to extrasynaptic GABAergic interneuron-to-NG2 glia signaling was observed in the barrel cortex, which was due to downregulation of the γ 2 subunit [19,20].

In the present study, we compared spontaneous and evoked GABA_A receptor-mediated currents of NG2 glia in the juvenile and adult hippocampus and asked whether the mode of interneuron–glial signaling changes during postnatal development. Moreover, molecular analyses were performed to reveal mechanisms of glial GABA_A receptor trafficking and clustering. We found a significant decrease in synaptic innervation of hippocampal NG2 glia between postnatal days (p) 10 and 60. At the adult stage, enhanced activation of extrasynaptic receptors was observed, indicating a spillover of GABA. This switch from synaptic to extrasynaptic receptor activation was accompanied by a downregulation of γ 2 and upregulation of the α 5 subunit.

In neurons, the γ 2 subunit is an important interaction partner of the scaffolding protein gephyrin and crucial for postsynaptic GABA_A receptor clustering. These γ 2-containing receptors form complexes with GARLH4 and neuroligin 2 [21,22]. For recruitment of gephyrin and maintenance of postsynaptic receptors, expression of collybistin, an interaction partner of neuroligin 2, is necessary [23,24]. In contrast, extrasynaptic α 5 containing GABA_A receptors are anchored to the cytoskeleton by radixin [25,26]. The mechanisms underlying formation of receptor clusters in NG2 glia are not known. Here, we report that gephyrin and radixin are organized in separate clusters along glial processes. Surprisingly, despite the significant loss of γ 2 and postsynaptic receptors with increasing postnatal age, in the glial cells, these changes were not accompanied by altered expression of scaffolding proteins, auxiliary receptor subunits or postsynaptic interaction proteins.

2. Results

2.1. GABAergic Synaptic Input to Hippocampal NG2 Glia Declines during Maturation

We compared spontaneous synaptic currents (sPSCs) of NG2 glia in the CA1 stratum radiatum at p10 and p60 using a blocking solution containing NBQX (10 μ M), D-APV (50 μ M) and CGP55845 (5 μ M) (original recordings shown in Figure 1A). We observed a significant reduction in sPSC frequency in cells of adult mice, and accordingly, the interevent interval between sPSCs was much longer at p60 (Figure 1B). In contrast, amplitude and kinetics of the sPSCs remained unchanged during development (Figure 1C,D).

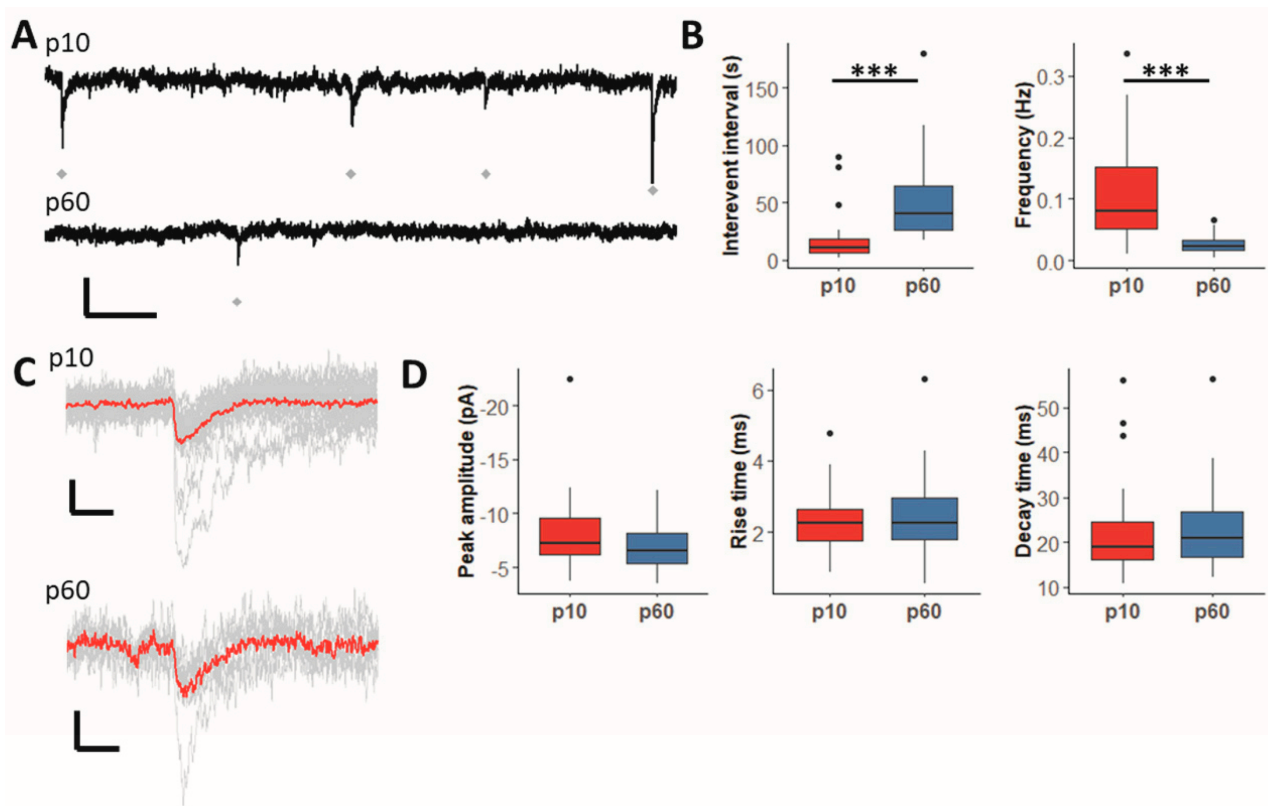


Figure 1. The frequency of spontaneous GABAergic PSCs is downregulated during postnatal development. (A) Original recordings of sPSCs in NG2 glial cells of juvenile (upper trace) and adult (lower trace) mice. Recordings were performed in the presence of 10 μ M NBQX, 50 μ M D-APV and 5 μ M CGP55845 to isolate GABAergic currents. Scale bars, 20 pA and 1 s. Gray diamonds indicate events. (B) Boxplots showing interevent interval and frequency of sPSCs for all recorded cells. The frequency was significantly lower at age p60 than at age p10 (p60: 0.0223 Hz, p10: 0.0795 Hz, $p < 0.001$). Thus, the interevent interval was significantly higher in adult mice than in juvenile mice (p60: 40.77 s, p10: 10.59 s, $p < 0.001$). (C) Recorded events (gray lines) and their average (red line) for a single NG2 cell at ages p10 (upper trace) and p60 (lower trace). Scale bars show 5 pA and 20 ms. (D) Boxplots showing peak amplitude, rise time (defined as rise time from 20% of peak amplitude to 80% of peak amplitude) and decay time (defined as the decay time constant τ). There was no significant difference between p10 and p60 for those parameters (amplitudes, p10: -7.28 pA, -9.54 pA– -6.20 pA; p60: -6.51 pA, -8.20 pA to -5.34 pA; $p = 0.079$; rise time, p10: 2.25 ms, 1.77–2.63 ms; p60: 2.25 ms, 1.81–2.98 ms; $p = 0.45$; decay time, p10: 18.93 ms, 16.15–24.58 ms; p60: 21.02 ms, 26.5–65.2 ms; $p = 0.72$). Mann–Whitney–U test, *** $p < 0.001$. p10: $n = 34$, $N = 13$; p60: $n = 31$, $N = 11$.

Next, miniature postsynaptic currents (mPSCs) were compared in the presence of the above blockers plus TTX (0.5 μ M, recording time 5 min, Figure 2A,C). As for sPSCs, only recordings with more than two mPSCs/5 min were included into the analysis. mPSCs occurred less frequently than sPSCs, but their frequency also declined during development, and the interevent intervals became longer (Figure 2B). Peak amplitude, rise and decay time of mPSCs remained unchanged during maturation (Figure 2D). Together, the data indicate that in the hippocampal CA1 region, interneuron-to-NG2 glia signaling is downregulated during postnatal development, possibly due to diminished synaptic innervation.

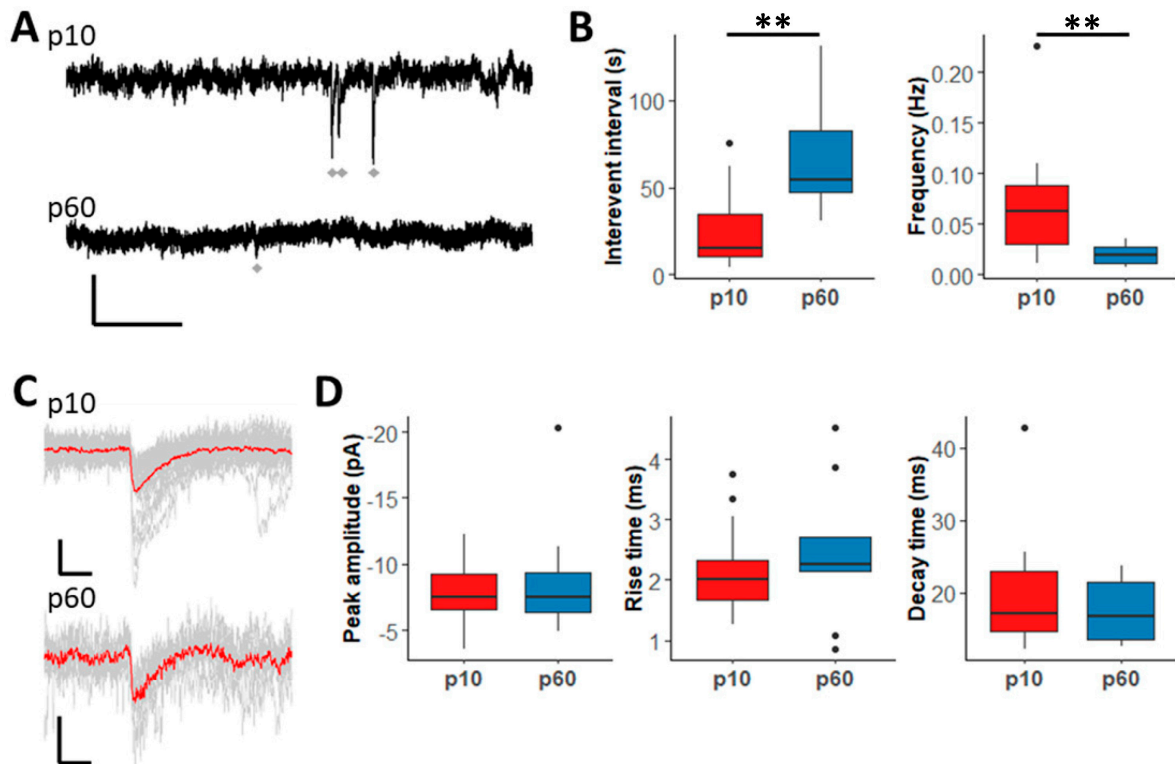


Figure 2. The frequency of GABAergic miniature PSCs in hippocampal NG2 cells is lower in adult animals. (A) Original recordings of mPSCs in NG2 cells of juvenile (upper trace) and adult (lower trace) animals. For recording, 0.5 μ M TTX was added to the blocking solution (10 μ M NBQX, 50 μ M D-APV and 5 μ M CGP55845). Gray diamonds indicate events. In p60 mice only few mPSCs could be observed. Scale bar shows 10 pA and 1 s. (B) Boxplots showing interevent interval and frequency of mPSCs for all recorded cells. At age p60, the interevent interval was significantly higher (p60: 54.02 s, p10: 15.28 s, $p < 0.01$) and the frequency was significantly lower (p60: 0.0191 Hz, p10: 0.063 Hz, $p < 0.01$) than at age p10. (C) Recorded mPSCs (gray lines) and their average (red line) for a single NG2 cell at ages p10 (upper trace) and p60 (lower trace). Scale bar shows 5 pA and 20 ms. (D) Boxplots showing peak amplitude (p10: -7.54 pA; p60: -7.46 pA, $p = 0.76$), rise time (p10: 2.01 ms; p60: 2.27 ms; $p = 0.59$) and decay time of mPSCs (p10: 17.16 ms; p60: 16.73 ms; $p = 0.39$) did not differ between juvenile and adult mice. Mann–Whitney–U test, ** $p < 0.01$. p10: n = 20, N = 9; p60: n = 10, N = 9.

2.2. Pharmacological Analysis of Evoked Postsynaptic Currents (ePSCs)

We tested whether these functional changes were accompanied by alterations in postsynaptic receptor composition or anchoring. Given the low sPSCs frequency, for pharmacological analyses, we evoked PSCs (ePSCs) by near-field stimulation and assessed the efficiency of ligands for the benzodiazepine binding site changes during development (Figure 3). This site is located at the interface of α - and γ -subunits of GABA_A receptors [10]. Diazepam and zolpidem are γ subunit-specific modulators of GABA_A receptors. Receptors devoid of γ 2 are less sensitive to diazepam, while low concentrations of zolpidem selectively activate α 1/ γ 2 containing receptors [11,27]. In juvenile NG2 glia, diazepam enhanced ePSC amplitudes in five of seven cells while at p60, fewer cells were sensitive to the modulator (Figure 3(A1,A2)). Similarly, zolpidem potentiated ePSCs more frequently in juvenile NG2 glia (Figure 3(B1,B2)). Overall, the decreased sensitivity of GABA_A receptors to diazepam and zolpidem in adult NG2 glia might have indicated a developmental downregulation of the γ 2 subunit.

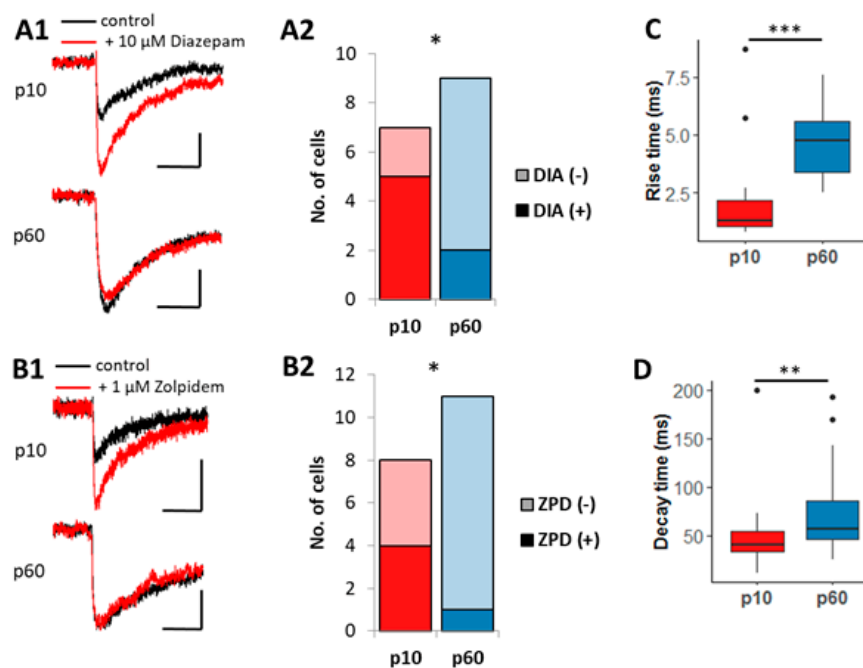


Figure 3. Evoked GABAergic postsynaptic currents in NG2 glia of juvenile mice are more sensitive to the $\gamma 2$ subunit selective modulators diazepam and zolpidem. GABAergic ePSCs were evoked by electrical near-field stimulation and recorded in the presence of 10 μM NBQX and 50 μM D-APV. (A1,B1) Averaged ePSCs of a single NG2 cell under control conditions (black traces) and after applying 10 μM diazepam (A1, red trace) or 1 μM zolpidem (B1, red trace) at p10 (upper traces) and p60 (lower traces). Scale bars: 4 pA, 50 ms; stimulation artefacts were blanked. In sensitive cells, diazepam and zolpidem increased ePSC amplitudes. (A2) Plot comparing the number of diazepam-sensitive cells (DIA (+), dark color) and insensitive cells (DIA (-), light color) at ages p10 and p60. At age p10, more cells were sensitive to diazepam (p10: 5/7 cells; p60: 2/9 cells; $p < 0.05$). (B2) Plot comparing the number of zolpidem-sensitive cells (ZPD (+), dark color) and non-sensitive cells (ZPD (-), light color) in juvenile and adult mice. At the juvenile stage, more cells were sensitive to zolpidem (p10: 4/8 cells; p60: 1/11 cells; $p < 0.05$). Chi-square test; * $p < 0.05$. (C,D) Boxplots comparing rise (C) and decay times (D) of ePSCs in control conditions between p10 and p60. Both parameters (rise time p10: 1.28 ms, $n = 17$, $N = 8$; p60: 4.74 ms, $n = 11$, $N = 7$; $p < 0.001$; decay time p10: 40.56 ms, $n = 23$, $N = 8$; p60: 57.36 ms, $n = 21$, $N = 7$; $p < 0.01$) were slower in adult mice. Rise time was only determined if the stimulus artefact did not overlay with the event. Mann-Whitney-U test, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Comparing the kinetics of ePSCs, we found that rise time and decay time slowed down with increasing age (Figure 3C,D). For rise time analysis, only recordings where stimulus artefacts were clearly separated from the ePSCs were included. Slower event kinetics could indicate that in NG2 glia of adult hippocampus, phasic GABAergic responses were also due to GABA spillover and activation of extrasynaptic receptors.

2.3. Enhanced GABA Spillover and Extrasynaptic Receptor Activation in Adult NG2 Glia

To further pursue the hypothesis of spillover-mediated activation of NG2 glia at the adult stage, GABA transporters (GATs) were blocked. Two types of GATs are expressed in the mouse hippocampus, GAT-1 and GAT-3 [28,29], with the former being present in extrasynaptic membranes of presynaptic neurons while the latter has been mainly found in astrocytes. These transporters limit GABA diffusion and help keeping synaptic and extrasynaptic neurotransmitter levels constant [30]. We blocked GAT-1 and GAT-3 with NNC-711 and SNAP-5114, respectively, while evoking PSCs at interneuron-to-NG2 glia synapses in the CA1 stratum radiatum. At p10, neither NNC-711 nor SNAP-5114 had an effect on ePSC kinetics upon low-frequency, single pulse stimulation (Figure 4). In contrast,

at p60, blocking GABA uptake significantly prolonged the decay (Figure 4). As expected, the effect of NNC-711 was stronger than that of SNAP-5114 (two sample *t*-test $p < 0.01$), reflecting the primary role of GAT-1 in regulating extrasynaptic GABA concentration due to its higher expression and more proximal localization to the synaptic cleft. These results are in line with the hypothesis that during later stages of development, NG2 glia detect GABAergic input predominantly through extrasynaptic receptors.

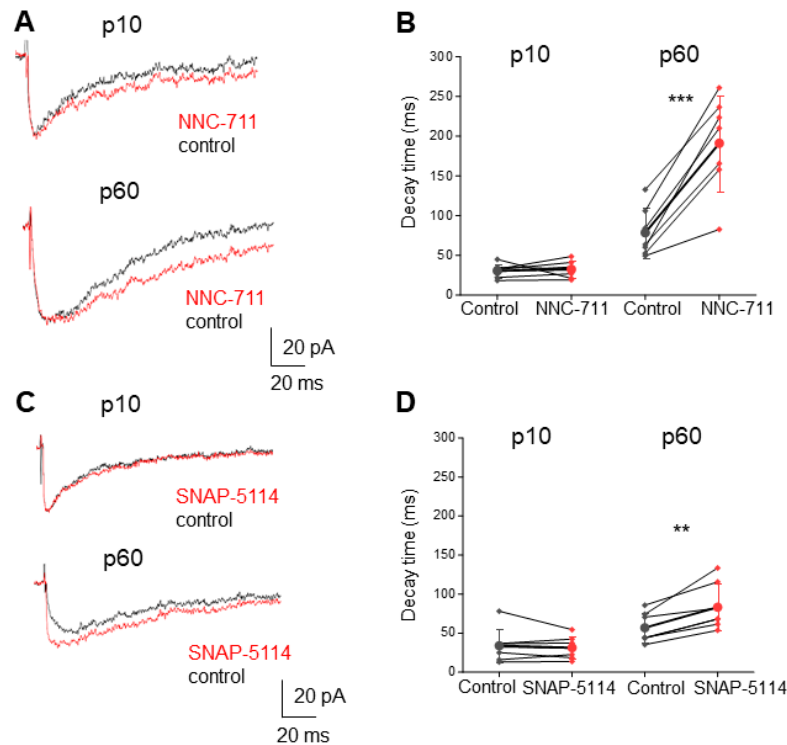


Figure 4. GABA uptake blockers prolong ePSC decay only in adult NG2 glia. (A,C) Original recordings of ePSCs in NG2 glia at p10 and p60 before (black trace) and after application (red) of NNC-711 (A, 10 μ M) and SNAP-5114 (C, 100 μ M). Bath solution contained 10 μ M NBQX, 50 μ M D-APV and 5 μ M CGP55845. (B,D) Plots comparing changes in decay time constant (mono-exponential fit) after application of NNC-711 (B; p10 control: 30.52 ± 8.72 ms; NNC-711: 32.22 ± 10.66 ms, $n = 7$, $N = 5$; $p = 0.73$; p60 control: 78.42 ± 31.14 ms; NNC-711: 190.96 ± 60.32 ms, $n = 7$, $N = 4$; $p < 0.001$) and SNAP-5114 (D; p10: control: 33.95 ± 21.63 ms; SNAP-5114: 31.35 ± 14.41 ms, $n = 7$; $N = 4$; $p = 0.53$; p60 control: 56.83 ± 19.45 ms; SNAP-5114: 83.18 ± 30 ms, $N = 3$, $n = 7$; $p < 0.01$). Thus, only at the adult stage, inhibition of GABA uptake slowed ePSC decay. Paired *t*-test; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

2.4. GABAergic Input onto Adult Hippocampal NG2 Glia Is Mediated by $\alpha 5$ -Containing Receptors

We further characterized pharmacological properties of extrasynaptic currents GABA_A receptors in NG2 glia. To increase ambient GABA concentration and unmask tonic currents, nipecotic acid, a broad spectrum GABA transporter inhibitor, was applied (1 mM, at least 3 min). Subsequent addition of the competitive GABA_A receptor antagonist, bicuculline (20 μ M), induced a positive shift in holding current, which was due to block of GABA-mediated tonic currents (Figure 5A). The amplitudes of tonic currents did not change during development (Figure 5B). The $\alpha 5$ subunit of GABA_A receptors is mainly expressed extrasynaptically [31]. To test for its functional expression in NG2 glia, the $\alpha 5$ -specific blocker $\alpha 5$ IA (0.5 mM) was applied subsequent to nipecotic acid (1 mM, at least 3 min). Two min after $\alpha 5$ IA, bicuculline (20 μ M) was added to block remaining tonic currents (Figure 5C), and the effect of $\alpha 5$ IA on the holding current was compared with the effect of $\alpha 5$ IA + bicuculline. Interestingly, the inhibitory effect of $\alpha 5$ IA was higher in NG2 glia of adult mice (Figure 5D), indicating that with ongoing development, an increasing proportion of $\alpha 5$ -bearing receptors contribute to the activation of NG2 glia by extrasynaptic GABA.

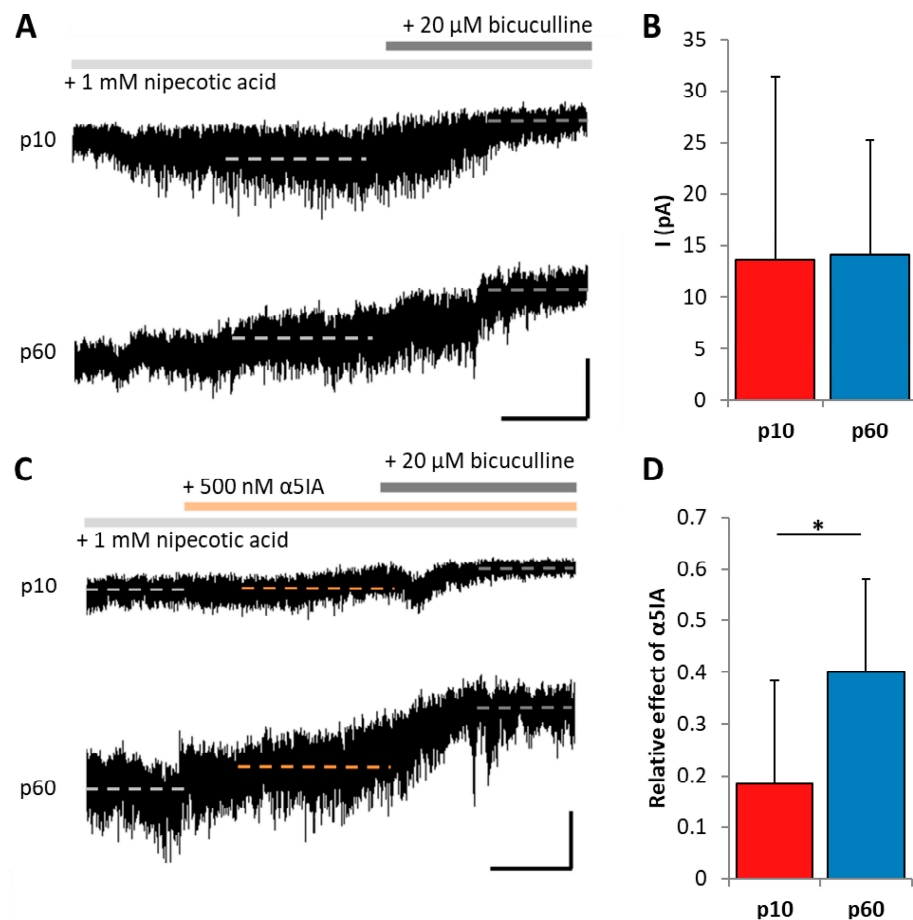


Figure 5. Tonic GABA currents of adult NG2 glia show higher sensitivity to $\alpha 5$ subunit blockage. (A) Original recordings of tonic currents in NG2 glia at p10 (upper trace) and p60 (bottom). The trace was smoothed by a boxcar averaging algorithm. Nipecotic acid (1 mM) was added to the bath solution for at least 3 min to increase extracellular GABA levels. Subsequent addition of bicuculline (20 μ M) induced a positive shift of holding current. The dashed line indicates the average of the labeled range in the presence of nipecotic acid (light gray) and nipecotic acid/bicuculline (dark gray), respectively. Scale bar: 10 pA, 50 s. (B) Bar graph showing the mean shift of holding current (p10: 13.72 ± 17.61 pA, $n = 17$, $N = 5$; p60: 14.15 ± 11.14 pA, $n = 14$, $N = 4$). There was no difference between ages (*t*-test; $p = 0.09$). (C) Original recording demonstrating the effect of the $\alpha 5$ subunit specific blocker, $\alpha 5$ IA, in NG2 glia of juvenile (upper trace) and adult mice (bottom). Nipecotic acid was applied as described in (A). Traces were smoothed as mentioned in (A). Subsequent application of $\alpha 5$ IA (500 nM) partially blocking tonic currents. After another 2 min, bicuculline (20 μ M) was added to the bath solution to block the remaining tonic current. Dashed line indicates the average of the labeled range in the presence of nipecotic acid (light gray), after addition of $\alpha 5$ IA (orange) and bicuculline (dark gray), respectively. Scale bar: 10 pA, 50 s. (D) Bar graph showing the relative effect of $\alpha 5$ IA on GABAergic tonic current. The shift in holding current induced by $\alpha 5$ IA was normalized to that induced by bicuculline. The relative effect of $\alpha 5$ IA was higher in p60 mice (p10: 0.18 ± 0.2 ; $n = 9$, $N = 5$; p60: 0.4 ± 0.18 , $n = 9$, $N = 4$). Two-sample *t*-test, * $p < 0.05$.

2.5. RT-PCR Substantiates Developmental Rearrangements of Glial GABA_A Receptors

To investigate putative structural changes accounting for the pharmacological changes of the receptors with increasing age, we isolated individual NG2 glia from the adult CA1 stratum radiatum, performed single-cell RT-PCR subsequent to their functional characterization (Figure 6A) and compared the data with the juvenile stage that we had previously analyzed [17]. Subunits $\beta 2$ and $\beta 3$ were differentiated using restriction analysis. The subunits $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ and $\alpha 5$ subunits displayed relative expression frequencies of 0.5,

0.81, 0.56, 0.56 and 0.88 ($n = 16$) while those of $\beta 1$, $\beta 2$ and $\beta 3$ were 0.5, 0.8 and 0.6 ($n = 16$). The frequency of $\gamma 1$, $\gamma 2$ and $\gamma 3$ were 0.88, 0.19 and 0.31 ($n = 17$) while the δ subunit was only rarely expressed (expression frequency 0.08; $n = 13$) (Figure 6B, blue bars). Compared to the juvenile expression pattern (red bars in Figure 5B), the frequency of $\alpha 5$ and $\alpha 3$ expression were strongly upregulated at p60 while $\beta 3$ and $\gamma 2$ were less frequently found in cells from adult mice. This shift in transcript expression pattern correlated well with the functional changes of the receptors during development.

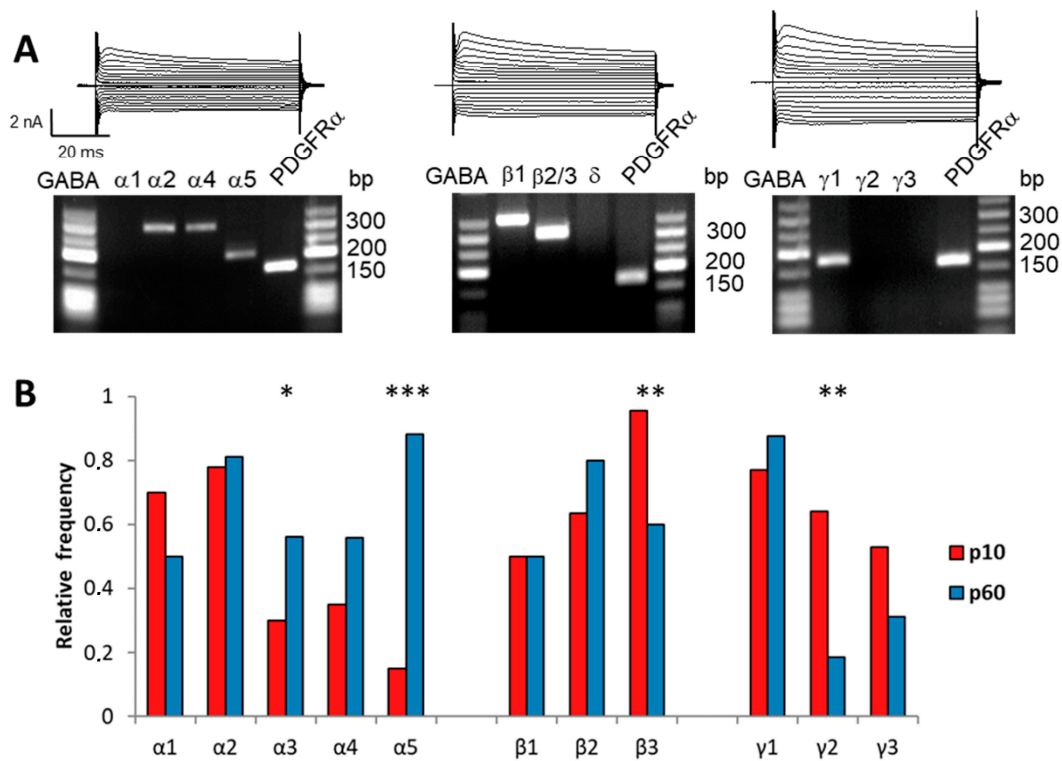


Figure 6. Subunit composition of GABA_A receptor in NG2 glia changes during development. (A) Single-cell RT-PCR was performed to analyze the expression of GABA_A receptor subunits by NG2 cells in the CA1 stratum radiatum at p60. Current patterns (voltage steps between -160 mV and $+20$ mV, increment 10 mV, holding potential -80 mV) of individual cells are shown together with the respective agarose gels of PCR products for α , β , γ and δ subunits. PDGFR α served as positive control. (B) Relative expression frequency of α , β and γ subunits at p60 (blue bars) compared to the juvenile stage (red; data obtained from [17]). $\beta 2$ and $\beta 3$ subunits were differentiated using restriction analysis. The frequencies of $\alpha 5$ and $\alpha 3$ expression were strongly upregulated at p60 (p10: 0.15 and 0.3 vs. p60: 0.88 and 0.56; $p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively). In contrast, $\beta 3$ and $\gamma 2$ transcripts were less frequent in cells from adult mice (p10: 0.95 and 0.64 vs. p60: 0.6 and 0.19; $p < 0.01$ each). Chi-square test; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

To further elaborate alterations of $\alpha 5$ and $\gamma 2$ subunit expression with progressing age, we performed semiquantitative real-time RT-PCR with FAC-sorted NG2 glia. The normalized $\gamma 2$ expression level was again reduced in adulthood (p10: 0.012 ± 0.009 , $n = 13$; p60: 0.004 ± 0.004 , $n = 13$; $p < 0.05$) while $\alpha 5$ remained unchanged (p10: 0.003 ± 0.002 , $n = 11$; p60: 0.005 ± 0.005 , $n = 13$; $p = 0.27$; t -test).

2.6. GABA_A Receptor Clustering in Hippocampal NG2 Glia

We wondered whether the alterations of synaptic innervation and transcript expression were accompanied by changes in clustering of GABA_A receptors in developing NG2 glia. Structurally, synapses in NG2 glia look similar to neuron–neuron synapses [32], but formation of GABA_A receptor clusters at glial postsynapses has not yet been investigated.

Passlick et al. [33] reported that NG2 glia express neuroligin-2, which in neurons is important for formation and maturation of inhibitory receptors. Interacting with gephyrin and collybistin, it anchors GABA_A receptors to the cytoskeleton of the postsynapse [23,24]. Other important neuronal anchoring proteins are LHFPL4, also known as GARLH4, interacting with $\gamma 2$, α and β subunits [21,22] and radixin (Rdx), which is critical for extrasynaptic GABA_A receptor $\alpha 5$ cluster formation [25,26]. We performed single-cell RT-PCR to test the glial cells for expression of those molecules. All four anchoring proteins were found in developing hippocampal NG2 glia (Figure 7), with their relative expression frequencies remaining unchanged during development (Figure 7C). Since $\alpha 5$ increased in adulthood (Figure 6B), we also performed real-time RT-PCR with FAC-sorted hippocampal NG2 glia to test for potential regulation of radixin. However, radixin levels remained unchanged during development (Figure 7D). Thus, expression of the anchoring molecules collybistin, gephyrin, GARLH4 and radixin by hippocampal NG2 glia is not developmentally regulated.

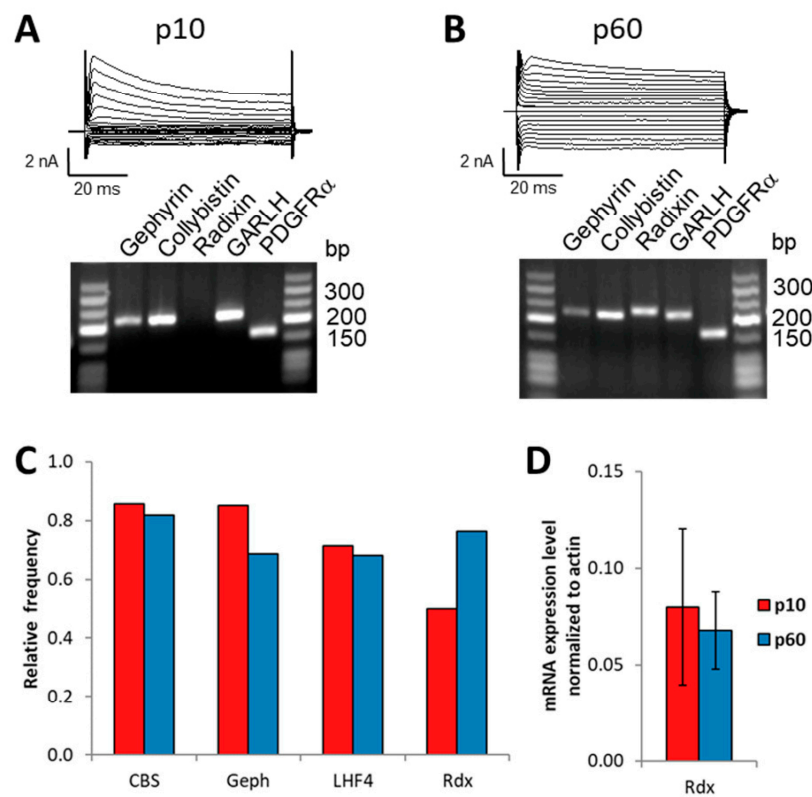


Figure 7. Hippocampal NG2 glia express transcripts for postsynaptic and extrasynaptic GABA_A receptor clustering proteins and auxiliary receptor subunits. (A,B) Single-cell RT-PCR of NG2 glia was performed to detect GABA_A receptor anchoring proteins. Current patterns (voltage steps between -160 mV and $+20$ mV, 10 mV increment, holding potential -80 mV) are shown together with the respective agarose gel of PCR products for collybistin (CBS), gephyrin (Geph), radixin (Rdx) and GARLH4 (LHF4) at p10 (A) and p60 (B). PDGFR α served as positive control. (C) Single-cell RT-PCR analysis of different GABA_A receptor associated anchoring proteins at p10 (0.86, $n = 21$; 0.85, $n = 20$; 0.71, $n = 21$; 0.5, $n = 18$) and p60 (0.82, $n = 22$; 0.69, $n = 16$; 0.68, $n = 22$; 0.76, $n = 17$). There were no age-dependent differences ($p > 0.1$ in all cases, Chi-square test). (D) Real-time RT-PCR analysis for radixin performed on FAC-sorted NG2 glia from the hippocampus at p10 (normalized values; 0.08 ± 0.04 , $n = 15$) and p60 (0.068 ± 0.02 , $n = 13$). No age-dependent differences were found (t -test, $p = 0.33$).

Next, we applied immunocytochemistry and expansion microscopy to detect anchoring molecules on the protein level. Triple staining against GFP/EYFP (for identification of NG2 glia), gephyrin (postsynaptic clusters) and radixin (extrasynaptic clusters) was

performed in NG2-EYFPki mice at p60 (Figure 8). Z-stack evaluation and comparison with negative controls lacking first antibodies identified gephyrin- and radixin-positive puncta on glial membranes. Clusters of gephyrin and radixin puncta were observed on somata and processes of hippocampal NG2 glia. Gephyrin was also found in the cytoplasm. As in neurons [26], gephyrin and radixin puncta rarely overlapped indicating the presence of segregated clusters. Similar expression patterns of anchoring proteins were found along dendrites of Thy1-GFP-positive pyramidal cells (Figure 9), although in a few cases co-localization was obvious (Figure 9C).

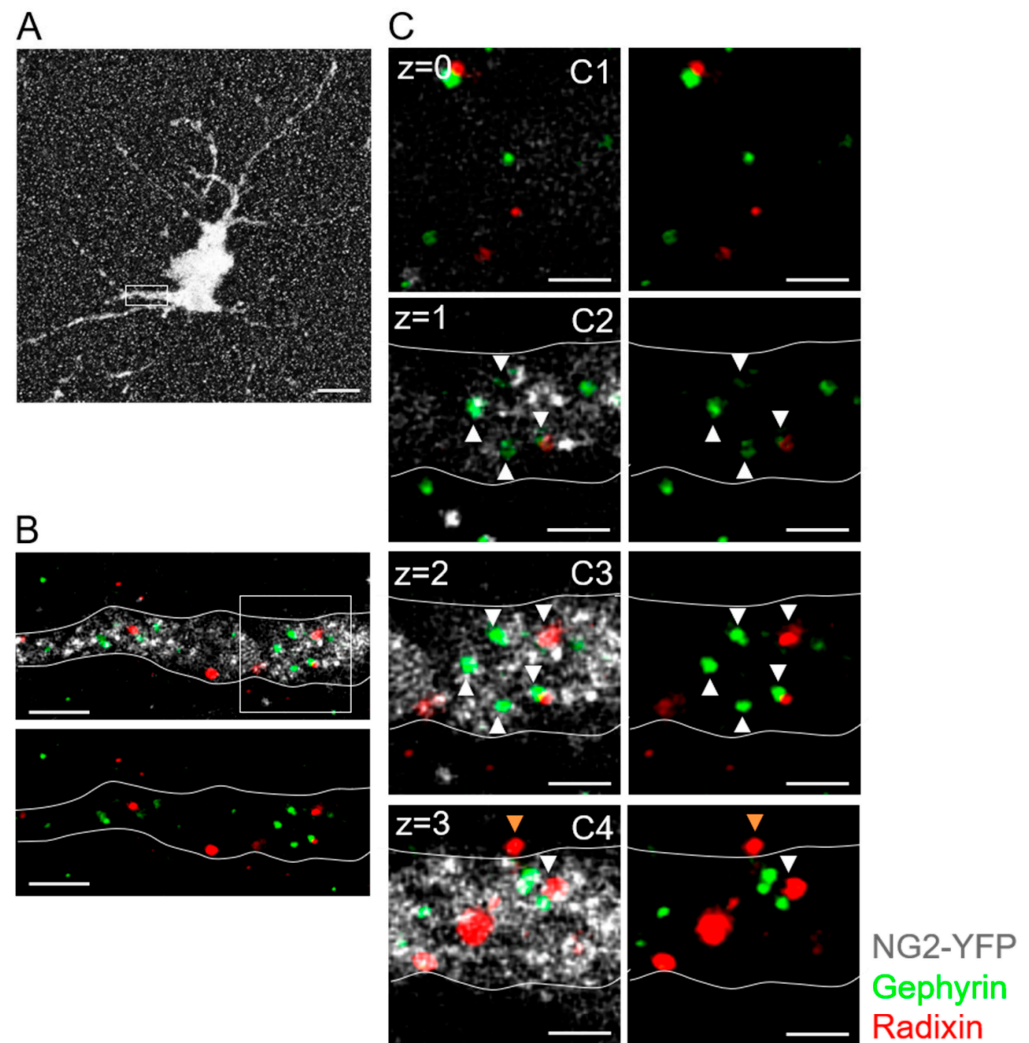


Figure 8. Expansion microscopy reveals gephyrin and radixin expression in processes of NG2 glia. (A) A single EYFP-positive NG2 glial cell in maximum z-stack projection is displayed after antibody staining against GFP (white). (B) Antibody staining against gephyrin (green) and radixin (red) in the boxed detail from (A) showed accumulation of gephyrin and radixin in a NG2 glial process (GFP, white). The lower panel displays gephyrin (green) and radixin (red) puncta in the cytoplasm and on the membrane without the GFP signal. Gephyrin and radixin mostly localized in separate clusters. (C) Inset box from (B) at higher magnification. Primary glial process showed localization of gephyrin and radixin in the cytoplasm (white arrowhead) or contacting the membrane surface (orange arrowhead) in consecutive z planes. Scale bar: (A): 5 μ m; (B): 1 μ m; (C): 500 nm. Z intervals = 2 μ m post-expansion, 435 \pm 39 nm pre-expansion.

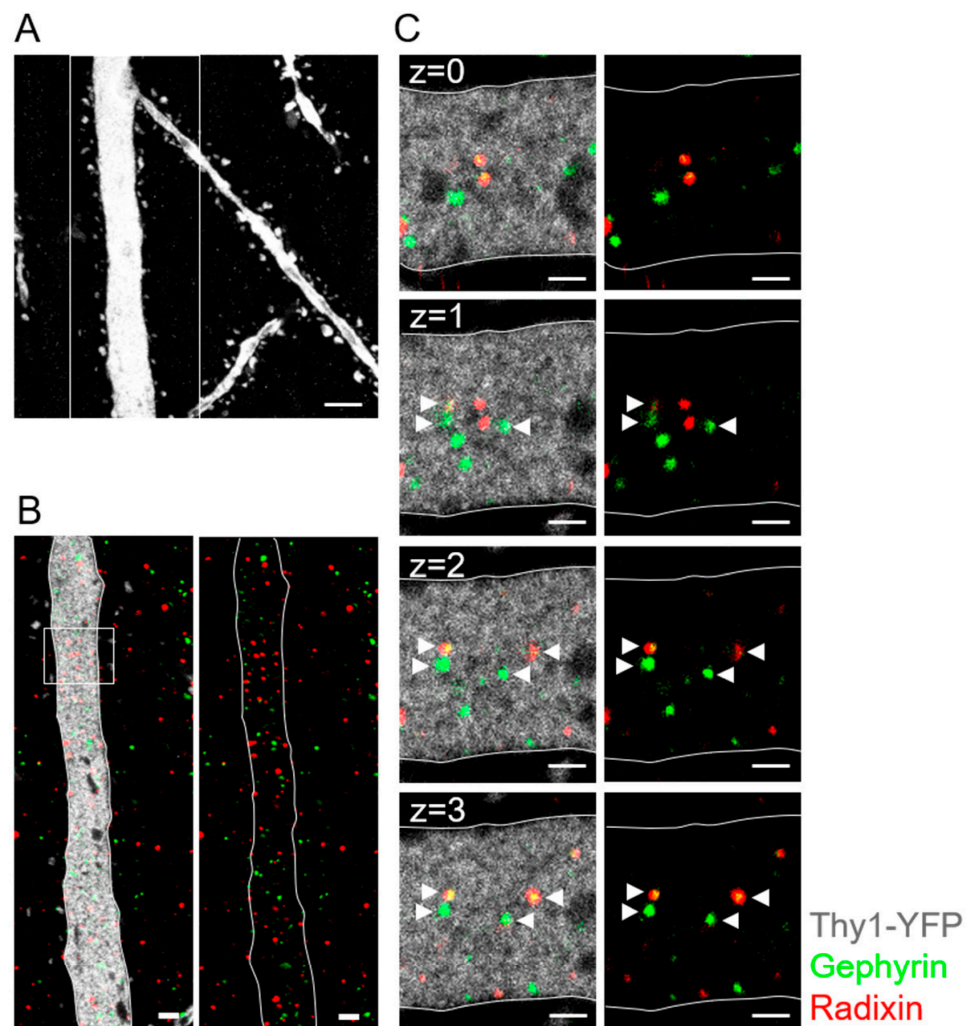


Figure 9. Expansion microscopy reveals gephyrin and radixin expression in dendrites of CA1 pyramidal neurons. (A) A single EYFP-positive dendrite of a CA1 pyramidal neuron in maximum z-stack projection is displayed after antibody staining against GFP (white). (B) Antibody staining against gephyrin (green) and radixin (red) in the boxed detail from (A) showed accumulation of gephyrin and radixin in the neuronal dendrite (GFP, white; single optical plane). The right panel displays gephyrin (green) and radixin (red) puncta in the cytoplasm of dendrite without the GFP signal. (C) Inset box from (B) at higher magnification. The primary dendrite showed localization of gephyrin and radixin in the cytoplasm (white arrowhead) in consecutive z planes. Note: co-localization of gephyrin and radixin in some clusters. Scale bar: (A): 2.5 μm ; (B): 1 μm ; (C): 500 nm. Z intervals = 0.5 μm post-expansion, 124 ± 7 nm pre-expansion.

3. Discussion

3.1. GABAergic Innervation of NG2 Glia Declines during Development

We report that GABAergic synaptic innervation of hippocampal NG2 glia decreased during postnatal maturation, indicated by reduced frequencies of spontaneous and miniature PSCs, which resembled developmental changes of the cells' glutamatergic input [33]. With increasing age, the amplitudes of tonic currents of the glial cells remained similar, but the currents were more sensitive to antagonists of the $\alpha 5$ -subunit, a component of extrasynaptic GABA_A receptors in neurons [26]. A similar developmental decrease in interneuron-NG2 glia synaptic signaling was observed in the barrel cortex [20], although in the adult hippocampus the sPSC frequency remained 10 times higher compared to the cortex (see also [16]). The former authors demonstrated that only at later stages of maturation, blocking GAT-1 led to increased ambient GABA, its spillover and slowed ePSC kinetics.

In our study, rise and decay times of ePSCs were also slower in NG2 glia from older mice, suggesting altered subunit composition and/or preferred activation of extrasynaptic glial receptors in those cells. Prenatally, NG2 glia form functional clusters with GABAergic interneurons, and these cell clusters persist in the neonatal cortex and provide the basis for the close interactions of both cell types [34]. Thereafter, initial NG2 glia die and are substituted by newly born cells [35].

3.2. Molecular Changes of Glial GABA Receptors

Previously, we have shown that a majority of juvenile NG2 glia in the hippocampus express postsynaptic $\gamma 2$ -containing GABA_A receptors and that extrasynaptic receptors of these cells lacked $\gamma 2$ [17]. In the developing barrel cortex, NG2 glia lose $\gamma 2$ [19], an essential component of postsynaptic GABA_A receptors acting as a binding partner of the scaffold protein, gephyrin [36–38]. In the present study, downregulation of $\gamma 2$ and synaptic signaling in the maturing hippocampus were accompanied by more frequent expression of $\alpha 5$ by NG2 glia. These molecular changes well corresponded to the functional alterations because (i) the tonic GABA receptor currents became more sensitive to an $\alpha 5$ subunit-specific antagonist and (ii) glial ePSC kinetics became slower, which is characteristic of $\alpha 5$ -containing receptors [39,40]. The frequency of $\gamma 1$ expression remained high in synaptic and extrasynaptic receptors of adult NG2 glia.

Deletion of $\gamma 2$ in juvenile cortical NG2 glia entailed lower frequencies and amplitudes of sPSCs, although glial proliferation, differentiation and Ca²⁺ signaling remained unaffected [41]. The density of NG2 glia decreases during development [42,43], but this decrease was even surpassed by $\gamma 2$ deletion, indicating a role of this subunit in NG2 glia maintenance [41]. Thus, the physiological decline in NG2 glia density might be due to the cells' developmental loss of $\gamma 2$ and GABAergic synaptic input. In cortical slice cultures, the opposite was found, i.e., blocking of GABA_A receptors in oligodendrocyte lineage cells increased their numbers, suggesting that the synaptic input *decreases* numbers of NG2 glia and oligodendrocytes [44]. GABA receptor activation in NG2 glia in slice cultures leads to a downregulation of $\alpha 1$ and $\beta 2$ subunits [44]. Other studies also suggested that differentiation and maintenance of NG2 glia are regulated by local GABAergic signaling [34,45]. In the juvenile neocortex, NG2 glia receive segregated synaptic input at proximal and distal sites from parvalbumin (PV)-positive, fast spiking and from PV-negative interneurons, respectively. Here, the proximal glial sites are equipped with $\gamma 2$ -containing receptors while the branches have receptors devoid of $\gamma 2$ [46]. The innervation pattern in the juvenile hippocampus might be similar because in both regions NG2 glia share a comparable distribution and composition of GABA_A receptors [17,19]. Putative interaction partners of hippocampal NG2 glia are CCK-positive interneurons, which are located in the stratum radiatum, and also PV/SOM-positive bistratified cells in the stratum pyramidale [47,48].

3.3. Tonic GABA Receptor Currents

In CA1 pyramidal neurons, $\alpha 5$ -containing GABA_A receptors are located extrasynaptically [49] to generate tonic currents [50–53]. These currents may reduce theta burst-induced LTP at CA3/CA1 synapses by preventing postsynaptic Ca²⁺ elevation and by increasing the threshold for LTP induction [54,55]. In NG2 glia, the amplitudes of tonic currents were the same in juvenile and adult mice, but only in the latter, part of the currents were mediated by $\alpha 5$ containing receptors. It is possible that in addition to neurons, astrocytes might have released GABA into the extracellular space and contributed to the tonic currents. Since juvenile NG2 glia have a very high input resistance, tonic GABA_A receptor activation and the resulting drop of the membrane resistance may fine-tune the efficiency of the excitatory GABAergic and glutamatergic synaptic input in these cells [17,33].

3.4. Auxiliary Subunits and Anchoring Proteins

The GABAergic innervation of NG2 glia raised the question whether these synapses are similarly organized as neuronal inhibitory synapses. Typically, inhibitory synapses in

neurons are formed by interactions of the $\gamma 2$ subunit with gephyrin [36,38,56]. Another essential component of the postsynaptic receptor complex is collybistin that binds to neuroligin 2 (NLG2) to allow gephyrin-dependent GABA_A receptor clustering [23,24]. Throughout postnatal development, NG2 glia also express NLG2 [33], as well as gephyrin, collybistin and GARLH4 (present study). The latter is an auxiliary, regulatory subunit important for clustering of GABA_A receptor subunits with NLG2, e.g., in pyramidal cells of the hippocampus [21,22]. The $\gamma 2$ subunit stabilizes GARLH4 expression in pyramidal cells. Despite downregulation of $\gamma 2$ and loss of synaptic receptors during development, GARLH4 remained expressed in almost all NG2 glia of the adult hippocampus.

The strong upregulation of the $\alpha 5$ subunit in NG2 glia with increasing age raised the question whether the cells also express radixin, which in neurons anchors $\alpha 5$ -containing GABA_A receptors to extrasynaptic sites [26,57]. Indeed, radixin transcripts were found in the majority of the glial cells, both in juvenile and adult mice, and expansion microscopy confirmed segregated co-expression of radixin and gephyrin clusters at postsynaptic sites of NG2 glia. Thus, the expression pattern of gephyrin and radixin in NG2 glia resembled that observed in CA1 pyramidal neurons, suggesting that the proteins also have similar functions in the glial cells.

3.5. Impact of GABA Receptors in NG2 Glia

NG2 cells in the cerebellar white matter are innervated by local interneurons, and this synaptic input regulates proliferation and maturation of the glial cells. Disruption of GABAergic activity stimulated proliferation of NG2 glia and delayed their differentiation into oligodendrocytes. This process is critically dependent on the presence of the Na/K/2Cl (NKCC1)-transporter, which delivers an elevated intracellular Cl⁻ concentration and explains why the GABAergic input causes depolarization of the glial cells [58]. Deletion of the $\gamma 2$ subunit in NG2 glia resulted in myelination deficits of the innervating PV⁺ fast spiking interneurons in the neocortex. As a consequence, the firing rate of these interneurons was reduced, as well as fast-forward inhibition of glutamatergic spiny stellate cells resulting in impaired whisker-based texture discrimination [59].

Due to the high intracellular Cl⁻ concentration of NG2, GABA receptor activation depolarizes the cells [16,17]. The same applies to immature neurons, where the transmitter was even shown to act as a trophic factor. Here, GABA-mediated depolarization activated voltage-gated Ca²⁺ channels and induced formation of postsynaptic gephyrin clusters and inhibitory synapses [60]. Because NG2 glia express a neuron-like set of GABA_A receptors and voltage-activated Ca²⁺ channels [17,32], and receptor activation mediates Ca²⁺ influx through these channels [16,32], it is conceivable that the GABAergic input serves similar functions in developing NG2 glia. Differentiation and proliferation of NG2 glia are critically dependent on neuronal activity [61]. Thus, the developmental decrease in synaptic innervation by GABAergic neurons could be a cause for the reduced proliferative potential of NG2 glia in the adult hippocampus [42]. Possibly, the GABAergic input to NG2 glia contributes to the release of neurotrophic factors from these cells and influences neuronal synaptic plasticity as demonstrated recently [43].

4. Materials and Methods

4.1. Animals

Experiments were performed with NG2-EYFPki mice [4] of both sexes that were either hetero- or homozygous for EYFP. These mice express EYFP under the control of the NG2 promoter allowing for reliable identification of NG2 cells by their fluorescent signal. Two developmental stages were compared, p7–10 (further on referred to as p10 group) and p54–75 (p60 group). Mice were kept under standard housing conditions in the animal facility of the Medical Faculty at University Bonn. All experiments were carried out in accordance with local, state and European regulations.

4.2. Preparation of Acute Hippocampal Slices for Patch-Clamp Recordings and Cell Harvesting

Mice were anesthetized with isoflurane and decapitated. Brains were removed and cut with a vibratome (Leica VT1200S) into 300 μm thick horizontal sections in cold (4 °C) preparation solution containing the following (in mM): 1.25 NaH_2PO_4 , 87 NaCl, 2.5 KCl, 7 MgCl_2 , 0.5 CaCl_2 , 25 glucose, 25 NaHCO_3 , and 61 sucrose (325–335 mOsm). After cutting, the slices were incubated for 15 min in preparation solution at 35 °C and afterwards transferred into artificial cerebrospinal fluid (aCSF) at 25 °C. aCSF consisted of the following (in mM): 1.25 NaH_2PO_4 , 126 NaCl, 3 KCl, 2 MgSO_4 , 2 CaCl_2 , 10 glucose, and 26 NaHCO_3 (305–315 mOsm). Both solutions were constantly oxygenated with carbogen (5% CO_2 /95% O_2).

4.3. Electrophysiology

4.3.1. Whole Cell Recordings

For patch-clamp recording, the slices were transferred into a recording chamber and constantly perfused with oxygenated aCSF. All experiments were conducted in the stratum radiatum of the CA1 region of the hippocampus at room temperature. An upright microscope (Nikon Eclipse E600FN, Nikon, Tokyo, Japan), equipped with infrared-DIC optics and epifluorescence, was used. NG2 glial cells were selected with a water-immersion 60 \times objective and identified by their EYFP fluorescence and their current pattern in the whole-cell configuration. Fluorescent somata enwrapping blood vessels (putative pericytes) were excluded. Cells were clamped at -80 mV. Recordings were obtained using an EPC9 amplifier (HEKA, Lambrecht, Germany), an EPC800 amplifier (HEKA) or a combination of an EPC7 amplifier with an ITC16 AD/DA board (HEKA) and monitored using TIDA 5.24 software (HEKA). Patch pipettes were prepared from borosilicate capillaries (Science Products GmbH, Hofheim am Taunus, Germany) and had a resistance of 2–5 $\text{M}\Omega$. For all experiments, except for cell harvesting (KCl-based), a CsCl-based intracellular solution was used, containing the following (in mM): 120 CsCl, 2 MgCl_2 , 0.5 CaCl_2 , 5 BAPTA, 10 HEPES, 3 $\text{Na}_2\text{-ATP}$, and 10 TEA. Series and membrane resistance were monitored in constant intervals.

4.3.2. Spontaneous and Miniature PSC

To record spontaneous postsynaptic currents (sPSC), a blocking solution containing 10 μM NBQX, 50 μM D-APV and 5 μM CGP55845 was applied via the perfusion system to isolate GABA_A receptor currents. After equilibration of the blocking solution in the recording chamber, spontaneous activity was recorded for 5 min. To record miniature postsynaptic currents (mPSC), 0.5 μM TTX was added to the blocking solution. mPSCs were recorded for 5–10 min. mPSCs were identified using template-based event detection (pClamp 10.0 software; Molecular Devices, San Jose, CA, USA). Events detected by template search were controlled visually before being accepted for further analysis, which was performed with Igor Pro 7 software (WaveMetrics, Lake Oswego OR, USA). Only recordings with at least two events were accepted for further calculations. Recordings were filtered at 1 kHz and sampled at 10 kHz.

4.3.3. Evoked PSCs

Evoked postsynaptic currents (ePSCs) were characterized to investigate pharmacological properties of phasic GABA_A receptor currents. ePSCs were evoked by near-field electrical stimulation [9]. A monopolar stimulation electrode, consisting of a Teflon-coated silver wire with a chlorinated tip and a low resistance (<1 $\text{M}\Omega$) aCSF-filled glass pipette, was placed close to the patch pipette. Stimuli were generated by a STG4004 stimulation device (Multichannel Systems, Reutlingen, Germany) in constant voltage mode. Cells were stimulated by applying a 100 μs biphasic single pulses every 15 s. At least 40 pulses were applied (~ 10 min) for each condition. To test for the presence of the $\gamma 2$ subunit, diazepam (10 μM) and zolpidem (1 μM) were added to the bath solution and its effects on ePSC amplitudes were tested. To isolate GABA_A receptor currents, the recordings were per-

formed in the presence of 10 μM NBQX and 50 μM D-APV, blockers of AMPA and NMDA receptors. Series and membrane resistance were monitored in equal intervals. Recordings were filtered at 3 kHz and sampled at 10 kHz.

Using Igor Pro 7 software, peak amplitude, rise time (20–80%) and decay time were quantified. The effects of diazepam and zolpidem on receptor currents were determined as the ratios of the mean peak amplitudes in the presence of the drug and the mean peak amplitudes in control condition, individually for each cell recorded.

4.3.4. Tonic Currents

To detect tonic currents, 1 mM nipecotic acid, a GABA transporter blocker, was added to the bath solution for at least 3 min to elevate the extracellular GABA concentration. Tonic currents were then unmasked by adding 20 μM bicuculline, inducing a positive shift in the holding current due to blocking of GABA_A receptors. Only cells with stable holding currents (2 min) before application of nipecotic acid were included. To investigate pharmacological properties of tonic currents, the $\alpha 5$ subunit-specific blocker, $\alpha 5\text{IA}$, was used. First, 1 mM nipecotic acid was applied (at least 3 min to determine the baseline), and then, $\alpha 5\text{IA}$ (500 nM) was added. Two min later, 20 μM of bicuculline was added to the bath solution. The effect of $\alpha 5\text{IA}$ was then determined by measuring the shift of the holding current induced by application of $\alpha 5\text{IA}$ and normalizing it to the shift of the holding current induced by bicuculline. In the following, this ratio is referred to as the relative effect of $\alpha 5\text{IA}$. Recordings were filtered at 1 kHz and sampled at 10 kHz.

4.4. Cell Harvesting and Single-Cell RT-PCR

For single-cell RT-PCR, cells were harvested with patch pipettes filled with KCl-based intracellular solution consisting of the following (in mM): 130 KCl, 2 MgCl₂, 0.5 CaCl₂, 5 BAPTA, 10 HEPES, and 3 Na₂-ATP. After electrophysiological recording, the cytoplasm of individual cells was carefully aspirated into the patch pipette under microscopic control. The whole content of the patch pipette was then transferred into a reaction tube containing 3 μL DEPC-treated water, frozen in liquid nitrogen and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until single-cell RT-PCR was performed.

Single-cell transcript analysis was performed as previously reported [62,63]. Reverse transcription (RT) was performed after addition of RT buffer (Invitrogen, Waltham, MA, USA), dNTPs ($4 \times 250\text{ }\mu\text{M}$), random hexamer primers (50 μM ; Roche, Basel, Switzerland), RNasin (20 U; Promega, Mannheim, Germany) and Maxima H minus reverse transcriptase (100 U; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 h. For the multiplex two-round single-cell PCR, primers for α , β , γ , δ GABA_A receptor subunits and for PDGFR α were used (see [17,19]). To identify the $\alpha 3$ and auxiliary subunits as well as mRNAs for scaffolding proteins, a separate PCR together with primers for PDGFR α was performed (Table 1). Briefly, the first PCR was performed after adding PCR buffer, MgCl₂ (2.5 mM), primers (200 nM each; 100 nM for PDGFR α), dNTPs ($4 \times 50\text{ }\mu\text{M}$) and 5 U *Taq* polymerase (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) to the RT product (final volume 50 μL). Thirty-five cycles were performed (denaturation at $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 25 s; annealing at $51\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 min for the first 5 cycles, and 45 s for the remaining cycles; extension at $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, 25 s; final elongation at $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, 7 min). An aliquot (2 μL) of the PCR product was used as template for the second PCR (35 cycles; annealing at $54\text{ }^{\circ}\text{C}$, first 5 cycles: 2 min, remaining cycles: 45 s) using nested primers. 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 using a molecular weight marker (low molecular weight marker, New England Biolabs, Frankfurt, Germany). As a positive control, RT-PCR for total RNA from mouse brain was run in parallel. Negative controls were performed using distilled water or bath solution for RT-PCR. The primers for the targets were located on different exons to prevent amplification of genomic DNA. To discriminate between $\beta 2$ and $\beta 3$ subunits, the PCR product was purified (MinElute PCR purification Kit, Qiagen, Hilden, Germany), and restriction analysis was performed (10 U enzyme, 6 h, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$). PstI cut the PCR product of $\beta 2$ subunit (307 bp)

into 169 and 138 bp, while BanI cut the $\beta 3$ product (307 bp) into fragments of 202 and 105 bp lengths.

Table 1. Primers used for single-cell RT-PCR.

Gene	Primer Sequence	Product Length	Position	Genbank Accession Number
Collybistin (<i>Arlhgef9</i>)	se 5'-CACGGAGCGCCATTACATCAA as 5'-GGCGGCAGGCCTCAAAGA	338 bp	339 659	NM_001033329
Collybistin (<i>Arlhgef9</i>) (nested)	se 5'-GTGCCGAAAGAGAAGGGACAT as 5'-CAGGCATCCAGGTGGTTGTTA	219 bp	396 594	
<i>Gephyrin</i>	se 5'-AGGTGCAGCAGCAAGGAGAACATT as 5'-GTTGTAACCCGCATCACTTGTCTT	365 bp	982 1323	NM_145965
<i>Gephyrin</i> (nested)	se 5'-TCTCCTTTTCCCCTGACG as 5'-TCCCAATGATGAAACGAT	221 bp	1063 1265	
<i>Radixin</i>	se 5'-CAGCGAGCAAAAGAGGAGGCAGAG as 5'-TGCTTCTTCACGCGTTCATTCTTC	443 bp	1138 1557	NM_009041
<i>Radixin</i> (nested)	se 5'-GCAAGCTGCTGACCAGATGAAG as 5'-TCCGTGGGAGGGATGACTG	234 bp	1215 1430	
<i>LHFPL4</i>	se 5'-TCTACAAGATCTGCGCCTGGATGC as 5'-TGGCCGCAGCACGGAACCTTACTGT	311 bp	371 658	NM_177763
<i>LHFPL4</i> (nested)	se 5'-ATGGCTGGGATGCTGAGACC as 5'-ACTGTAGTGCCACGAAATCTTTG	220 bp	443 639	
GABA _A -R $\alpha 3$ (<i>Gabra3</i>)	se 5'-TAACCGGCTTCGACCTGGACTTG as 5'-CAGCGTGTATTGTTAACCTCATTG	332 bp	237 545	NM_008067
GABA _A -R $\alpha 3$ (<i>Gabra3</i>) (nested)	se 5'-AGTTTGGCCCTGTGTCAGAC as 5'-AGAGGAGGGTCCCATATCTACC	241 bp	301 519	

Position 1 is the first nucleotide of the initiation codon. The length of PCR products was indicated as base pairs (bp). 'se' and 'as' indicate sense and antisense primers. All sense and antisense primers are located on different exons, respectively.

4.5. FACS sorting of NG2 Glial Cells and Semiquantitative Real-Time RT-PCR

Mice (NG2ki-EYFP, p10 and p60, male and female) were sacrificed, brains were dissected and the whole hippocampus was isolated under microscopic control (Stereo microscope, Zeiss, Germany). Cell suspension was prepared by mincing the tissue, digesting in papain at 37 °C for 15 min and incubating with DNaseI for another 10 min (Neural Dissociation Kit (P), Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Germany). The tissue was dissociated using Pasteur pipettes and filtered through a 70 μ m cell strainer. After addition of 10 mL HBSS (with Ca²⁺ and Mg²⁺) to the cell suspension, it was centrifuged at 300 g for 10 min. The pellet was suspended in 1 mL HBSS (without Ca²⁺ and Mg²⁺) and filtered through a 40 μ m cell strainer. Fluorescent NG2 cells were identified using EYFP fluorescence emission at 527 nm and sorted using a FACSariaIII flow cytometer (70 μ m nozzle, BD Biosciences, Heidelberg, Germany) into tubes containing HBSS (without Ca²⁺ and Mg²⁺). After centrifugation at 2000 g for 10 min, the supernatant was discarded and the cells were suspended in 200 μ L 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). Beads with the adherent mRNA were suspended in DEPC-treated water (20 μ L). For first strand synthesis, first strand buffer (Invitrogen), dithiothreitol (DTT, 10 mM), dNTPs (4 \times 250 μ M, Applied Biosystems, Waltham, MA, USA), oligo-dT₂₄-primer (5 μ M, Eurogentec, Seraing, Belgium), RNasin (40 U, Promega, Madison, WI, USA) and SuperscriptIII reverse transcriptase (400 U, Invitrogen) were added, and the reaction mix was incubated for 1 h at 50 °C (final volume 40 μ L).

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, and the reaction volume was 12.5 μL . PCRs for the respective target genes and β -actin, as housekeeping gene, were run in parallel wells for each sample, respectively, and triplicates for each sample were performed. Water served as 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. The target gene/ β -actin gene expression ratio was determined by comparing C_T values of the target gene with those of the reference gene, β -actin. The relative quantification of different genes was determined according to $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method:

$$X_{\text{target}}/X_{\beta\text{-actin}} = 2^{C_T\beta\text{-actin} - C_T\text{target}} \quad (1)$$

yielding a gene ratio with X being the input copy number and C_T the cycle number at threshold. By quantification of target gene expression against that of β -actin, ΔC_T was determined for each gene at the same fluorescence emission R_n .

4.6. Expansion Microscopy

Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of 70–90 μL of a xylazine (2%)/ketamine (100 mg/mL) mix in a ratio of 1:3. Afterwards, mice were transcardially perfused with 20–30 mL cold (4 °C) phosphate-buffered saline (PBS), followed by 20–30 mL 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS. The brains were removed and stored overnight in 4% PFA at 4 °C, transferred into PBS the next day and stored for at least one day at 4 °C before slicing. Brains were cut with a vibratome (Leica VT1200S) in cold (4 °C) PBS into 70 μm thick coronal slices. Slices were stored at 4 °C in PBS containing sodium azide until staining.

The expansion microscopy (ExM) protocol for imaging proteins with conventional primary and secondary antibodies was adopted from [64–66]. Fixed coronal hippocampal slices (70 μm thick) were blocked overnight at 4 °C in blocking buffer (5% normal goat serum, 1% Triton X-100 in PBS pH 7.4). Primary antibodies were incubated in blocking buffer for 48 h at 4 °C. Antibodies used were chicken anti-GFP (1:2000; ab13970, Abcam (Cambridge, UK) lot: GR236651-g), rabbit anti-Radixin (1:200; PA5-21660, Invitrogen), and mouse anti-Gephyrin (1:200; 147 021, Synaptic Systems, Göttingen, Germany). After washing (PBS, 3 \times 20 min, room temperature), secondary antibodies were incubated overnight at 4 °C in blocking buffer. Secondary antibodies used were goat anti-chicken Alexa Fluor 488 (1:200; A11039, ThermoFisher lot: 1691381, Waltham, MA, USA), goat anti-mouse Alexa Fluor 568 (1:200; A1131, ThermoFisher), and goat anti-rabbit biotin (1:200; 111-066-144, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA). The following day, after washing (PBS, 3 \times 20 min, RT), Hoechst 33342 was incubated for 10 min at room temperature in distilled water (1:2000). After washing (PBS, 3 \times 20 min, room temperature), the slices were pre-imaged with a 40 \times /1.1 NA objective in a Leica SP8 confocal microscope and a z-stack (1 μm interval) of the tip of dentate gyrus (DG) was acquired for expansion factor calculation (only Hoechst 33342 signal imaged). After staining, the slices were incubated with the linker molecule methylacrylic acid-NHS (1 mM) for 1 h at room temperature. After washing (PBS, 3 \times 20 min, room temperature), slices were incubated for 45 min at 4 °C in monomer solution (in g/100 mL PBS): 8.6 sodium acrylate, 2.5 acrylamide, 0.15 N,N'-methylenebisacrylamide, and 11.7 NaCl. Then, slices were incubated for 5 min at 4 °C in gelling solution (monomer solution supplemented with % (w/v): 0.01 4-hydroxy-TEMPO; 0.2 TEMED; 0.2 ammonium persulfate). Slices were placed in the gelling solution on a glass slide and the preparation was covered with a coverslip and incubated for 2 h at 37 °C. Coverslips and excess gel around the slice were removed, and gels incubated overnight at 25 °C in digestion buffer containing 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.5% Triton-X100, 0.8 M guanidine hydrochloride, 16 U/mL of proteinase K, pH 8.0. The following day, the digestion buffer was removed, and the gels were incubated with streptavidin Alexa Fluor 647 (1:200; 016–600-084, Jackson ImmunoResearch lot: 124695) in PBS for 2 h at room

temperature. For expansion, slices were then incubated in distilled water (pH 7.4 adjusted with NaOH) for 2.5 h, at room temperature, and water was exchanged repeatedly every 15–20 min. Finally, slices were mounted on poly-lysine coated μ -Slide 2 well Ibidi-chambers and sealed with a poly-lysine coated coverslip on top, adding a drop of water to prevent gel drying. Ibidi chambers and coverslips were coated by incubating with poly-L-lysine solution (0.01% *w/v* in water, P8920, Sigma-Aldrich lot: 050M4339, St. Louis, MO, USA) for at least 45 min at room temperature by shaking, and dried then with pressured air. Imaging of regions of interest was performed on a Leica SP8 inverted confocal microscope using a 40 \times /1.1 NA objective and hybrid detectors. Images were deconvoluted in Leica Systems software LASAF 3.3 and processed with Fiji 1.53. Prior to imaging the region of interest for each slice, the tip of the DG was imaged with a 20 \times /0.75 NA objective (z-stack 6 μ m interval with Hoechst 33342 signal only). The expansion factor was calculated by identifying the same cells labeled with Hoechst 33342 in the tip of DG before and after expansion and averaging the expansion factor of 10 measures.

4.7. Data Analysis and Statistics

Data analysis was performed using Igor Pro 7 and pClamp 10.0 software. Statistical analysis was carried out with R 3.5.0 software. All data were tested for normal distribution using Shapiro–Wilk test. Normally distributed data were tested for homogeneity of variance using Levene’s test and differences in data were tested for significance using Student’s *t*-test either with or without Welch correction accordingly. Differences in not normally distributed data were analyzed with Mann–Whitney-U test. Data from single-cell RT-PCR was tested for significant differences using Chi-square test. Level for significance was set as $p < 0.05$. Data are shown as bar plots with mean \pm SD or, in case of not normally distributed data, as Tukey’s box plots with median, quartiles (25% and 75%) and whiskers (± 1.5 times the interquartile range). Since no sex-specific differences were found in our analyses, data from male and female mice have been pooled.

Author Contributions: Conceptualization, G.S. and C.S.; methodology, G.S., R.J., C.H., C.S.; validation, L.P., D.T., C.D., A.T., R.J., C.H., G.S. and C.S.; formal analysis, L.P., D.T., C.D., A.T., R.J. and G.S.; investigation, L.P., D.T., C.D., A.T., R.J. and G.S.; data curation, L.P., D.T., C.D., R.J., G.S. and C.S.; writing—original draft preparation, L.P., D.T., C.D. and G.S.; writing—review and editing, L.P., C.D., R.J., C.H., G.S. and C.S.; visualization, L.P., D.T., C.D. and G.S.; supervision, C.H., G.S., R.J. and C.S.; project administration, G.S. and C.S.; funding acquisition, C.H., G.S. and C.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (STE 552/5, SE 774/6, HE 6949/1, HE 6949/3).

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in the article and on request from the corresponding authors.

Acknowledgments: We thank Thomas Erdmann and Silke Künzel (Institute of Cellular Neurosciences, University of Bonn) for expert technical assistance and manuscript editing.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Bergles, D.E.; Jabs, R.; Steinhäuser, C. Neuron–glia synapses in the brain. *Brain Res. Rev.* **2010**, *63*, 130–137. [[CrossRef](#)]
2. Dimou, L.; Simon, C.; Kirchhoff, F.; Takebayashi, H.; Götz, M. Progeny of Olig2-expressing progenitors in the gray and white matter of the adult mouse cerebral cortex. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 10434–10442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Kang, S.H.; Fukaya, M.; Yang, J.K.; Rothstein, J.D.; Bergles, D.E. NG2+ CNS glial progenitors remain committed to the oligodendrocyte lineage in postnatal life and following neurodegeneration. *Neuron* **2010**, *68*, 668–681. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Degen, J.; Dublin, P.; Zhang, J.; Dobrowolski, R.; Jokwitz, M.; Karram, K.; Trotter, J.; Jabs, R.; Willecke, K.; Steinhäuser, C.; et al. Dual reporter approaches for identification of Cre efficacy and astrocyte heterogeneity. *FASEB J.* **2012**, *26*, 4576–4583. [[CrossRef](#)]
6. Seifert, G.; Steinhäuser, C. Heterogeneity and function of hippocampal macroglia. *Cell Tissue Res.* **2018**, *373*, 653–670. [[CrossRef](#)]

7. Bergles, D.E.; Roberts, J.D.; Somogyi, P.; Jahr, C.E. Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature* **2000**, *405*, 187–191. [[CrossRef](#)]
8. Lin, S.C.; Bergles, D.E. Synaptic signaling between GABAergic interneurons and oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nat. Neurosci.* **2004**, *7*, 24–32. [[CrossRef](#)]
9. 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. [[CrossRef](#)]
10. Mehta, A.K.; Ticku, M.K. An update on GABAA receptors. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **1999**, *29*, 196–217. [[CrossRef](#)]
11. Hevers, W.; Luddens, H. The diversity of GABAA receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABAA channel subtypes. *Mol. Neurobiol.* **1998**, *18*, 35–86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Olsen, R.W.; Sieghart, W. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: Classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacol. Rev.* **2008**, *60*, 243–260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Garaschuk, O.; Hanse, E.; Konnerth, A. Developmental profile and synaptic origin of early network oscillations in the CA1 region of rat neonatal hippocampus. *J. Physiol. Lond.* **1998**, *507*, 219–236. [[CrossRef](#)]
14. Rivera, C.; Voipio, J.; Payne, J.A.; Ruusuvuori, E.; Lahtinen, H.; Lamsa, K.; Pirvola, U.; Saarma, M.; Kaila, K. The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* **1999**, *397*, 251–255. [[CrossRef](#)]
15. Stein, V.; Hermans-Borgmeyer, I.; Jentsch, T.J.; Hubner, C.A. Expression of the KCl cotransporter KCC2 parallels neuronal maturation and the emergence of low intracellular chloride. *J. Comp. Neurol.* **2004**, *468*, 57–64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Tanaka, Y.; Tozuka, Y.; Takata, T.; Shimazu, N.; Matsumura, N.; Ohta, A.; Hisatsune, T. Excitatory GABAergic activation of cortical dividing glial cells. *Cereb. Cortex* **2009**, *19*, 2181–2195. [[CrossRef](#)]
17. Passlick, S.; Grauer, M.; Schafer, C.; Jabs, R.; Seifert, G.; Steinhäuser, C. Expression of the gamma2-subunit distinguishes synaptic and extrasynaptic GABA(A) receptors in NG2 cells of the hippocampus. *J. Neurosci.* **2013**, *33*, 12030–12040. [[CrossRef](#)]
18. Arellano, R.O.; Sanchez-Gomez, M.V.; Alberdi, E.; Canedo-Antelo, M.; Chara, J.C.; Palomino, A.; Perez-Samartin, A.; Matute, C. Axon-to-Glia Interaction Regulates GABAA Receptor Expression in Oligodendrocytes. *Mol. Pharmacol.* **2016**, *89*, 63–74. [[CrossRef](#)]
19. Balia, M.; Velez-Fort, M.; Passlick, S.; Schafer, C.; Audinat, E.; Steinhäuser, C.; Seifert, G.; Angulo, M.C. Postnatal down-regulation of the GABAA receptor gamma2 subunit in neocortical NG2 cells accompanies synaptic-to-extrasynaptic switch in the GABAergic transmission mode. *Cereb. Cortex* **2015**, *25*, 1114–1123. [[CrossRef](#)]
20. Velez-Fort, M.; Maldonado, P.P.; Butt, A.M.; Audinat, E.; Angulo, M.C. Postnatal switch from synaptic to extrasynaptic transmission between interneurons and NG2 cells. *J. Neurosci.* **2010**, *30*, 6921–6929. [[CrossRef](#)]
21. Yamasaki, T.; Hoyos-Ramirez, E.; Martenson, J.S.; Morimoto-Tomita, M.; Tomita, S. GARLH Family Proteins Stabilize GABA(A) Receptors at Synapses. *Neuron* **2017**, *93*, 1138–1152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Davenport, E.C.; Pendolino, V.; Kontou, G.; McGee, T.P.; Sheehan, D.F.; Lopez-Domenech, G.; Farrant, M.; Kittler, J.T. An Essential Role for the Tetraspanin LHFPL4 in the Cell-Type-Specific Targeting and Clustering of Synaptic GABA(A) Receptors. *Cell Rep.* **2017**, *21*, 70–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Pouloupoulos, A.; Aramuni, G.; Meyer, G.; Soykan, T.; Hoon, M.; Papadopoulos, T.; Zhang, M.; Paarmann, I.; Fuchs, C.; Harvey, K.; et al. Neuroligin 2 drives postsynaptic assembly at perisomatic inhibitory synapses through gephyrin and collybistin. *Neuron* **2009**, *63*, 628–642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Papadopoulos, T.; Soykan, T. The role of collybistin in gephyrin clustering at inhibitory synapses: Facts and open questions. *Front. Cell Neurosci.* **2011**, *5*, 11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Hausrat, T.J.; Muhia, M.; Gerrow, K.; Thomas, P.; Hirdes, W.; Tsukita, S.; Heisler, F.F.; Herich, L.; Dubroqua, S.; Breiden, P.; et al. Radixin regulates synaptic GABAA receptor density and is essential for reversal learning and short-term memory. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6872. [[CrossRef](#)]
26. Loebrich, S.; Bähring, R.; Katsuno, T.; Tsukita, S.; Kneussel, M. Activated radixin is essential for GABAA receptor alpha5 subunit anchoring at the actin cytoskeleton. *EMBO J.* **2006**, *25*, 987–999. [[CrossRef](#)]
27. Olsen, R.W.; Sieghart, W. GABAA receptors: Subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology* **2009**, *56*, 141–148. [[CrossRef](#)]
28. Frahm, C.; Draguhn, A. GAD and GABA transporter (GAT-1) mRNA expression in the developing rat hippocampus. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **2001**, *132*, 1–13. [[CrossRef](#)]
29. Brunskine, C.; Passlick, S.; Henneberger, C. Structural Heterogeneity of the GABAergic Tripartite Synapse. *Cells* **2022**, *11*, 3150. [[CrossRef](#)]
30. Kersante, F.; Rowley, S.C.; Pavlov, I.; Gutierrez-Mecinas, M.; Semyanov, A.; Reul, J.M.; Walker, M.C.; Linthorst, A.C. A functional role for both -aminobutyric acid (GABA) transporter-1 and GABA transporter-3 in the modulation of extracellular GABA and GABAergic tonic conductances in the rat hippocampus. *J. Physiol.* **2013**, *591*, 2429–2441. [[CrossRef](#)]
31. Olsen, R.W. GABA(A) receptor: Positive and negative allosteric modulators. *Neuropharmacology* **2018**, *136*, 10–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Haberlandt, C.; Derouiche, A.; Wyczynski, A.; Haseleu, J.; Pohle, J.; Karram, K.; Trotter, J.; Seifert, G.; Frotscher, M.; Steinhäuser, C.; et al. Gray Matter NG2 Cells Display Multiple Ca-Signaling Pathways and Highly Motile Processes. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e17575. [[CrossRef](#)]

33. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Orduz, D.; Benamer, N.; Ortolani, D.; Coppola, E.; Vigier, L.; Pierani, A.; Angulo, M.C. Developmental cell death regulates lineage-related interneuron-oligodendroglia functional clusters and oligodendrocyte homeostasis. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 4249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Kessar, N.; Fogarty, M.; Iannarelli, P.; Grist, M.; Wegner, M.; Richardson, W.D. Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat. Neurosci.* **2006**, *9*, 173–179. [[CrossRef](#)]
36. Essrich, C.; Lorez, M.; Benson, J.A.; Fritschy, J.M.; Luscher, B. Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nat. Neurosci.* **1998**, *1*, 563–571. [[CrossRef](#)]
37. Kneussel, M.; Betz, H. Clustering of inhibitory neurotransmitter receptors at developing postsynaptic sites: The membrane activation model. *Trends Neurosci.* **2000**, *23*, 429–435. [[CrossRef](#)]
38. Alldred, M.J.; Mulder-Rosi, J.; Lingenfelder, S.E.; Chen, G.; Luscher, B. Distinct gamma2 subunit domains mediate clustering and synaptic function of postsynaptic GABAA receptors and gephyrin. *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 594–603. [[CrossRef](#)]
39. Burgard, E.C.; Tietz, E.I.; Neelands, T.R.; Macdonald, R.L. Properties of recombinant gamma-aminobutyric acid A receptor isoforms containing the alpha 5 subunit subtype. *Mol. Pharmacol.* **1996**, *50*, 119–127.
40. Capogna, M.; Pearce, R.A. GABA A, slow: Causes and consequences. *Trends Neurosci.* **2011**, *34*, 101–112. [[CrossRef](#)]
41. Balia, M.; Benamer, N.; Angulo, M.C. A specific GABAergic synapse onto oligodendrocyte precursors does not regulate cortical oligodendrogenesis. *Glia* **2017**, *65*, 1821–1832. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Moshrefi-Ravasdjani, B.; Dublin, P.; Seifert, G.; Jennissen, K.; Steinhäuser, C.; Kafitz, K.W.; Rose, C.R. Changes in the proliferative capacity of NG2 cell subpopulations during postnatal development of the mouse hippocampus. *Brain Struct. Funct.* **2017**, *222*, 831–847. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Timmermann, A.; Tascio, D.; Jabs, R.; Boehlen, A.; Domingos, C.; Skubal, M.; Huang, W.; Kirchhoff, F.; Henneberger, C.; Bilkei-Gorzo, A.; et al. Dysfunction of NG2 glial cells affects neuronal plasticity and behavior. *Glia* **2023**, *71*, 1481–1501. [[CrossRef](#)]
44. Hamilton, N.B.; Clarke, L.E.; Arancibia-Carcamo, I.L.; Kougioumtzidou, E.; Matthey, M.; Karadottir, R.; Whiteley, L.; Bergersen, L.H.; Richardson, W.D.; Attwell, D. Endogenous GABA controls oligodendrocyte lineage cell number, myelination, and CNS internode length. *Glia* **2017**, *65*, 309–321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. 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. [[CrossRef](#)]
46. Orduz, D.; Maldonado, P.P.; Balia, M.; Velez-Fort, M.; de Sars, V.; Yanagawa, Y.; Emiliani, V.; Angulo, M.C. Interneurons and oligodendrocyte progenitors form a structured synaptic network in the developing neocortex. *Elife* **2015**, *4*, e06953. [[CrossRef](#)]
47. Pelkey, K.A.; Chittajallu, R.; Craig, M.T.; Tricoire, L.; Wester, J.C.; McBain, C.J. Hippocampal GABAergic Inhibitory Interneurons. *Physiol. Rev.* **2017**, *97*, 1619–1747. [[CrossRef](#)]
48. Booker, S.A.; Vida, I. Morphological diversity and connectivity of hippocampal interneurons. *Cell Tissue Res.* **2018**, *373*, 619–641. [[CrossRef](#)]
49. Caraiscos, V.B.; Elliott, E.M.; You-Ten, K.E.; Cheng, V.Y.; Belelli, D.; Newell, J.G.; Jackson, M.F.; Lambert, J.J.; Rosahl, T.W.; Wafford, K.A.; et al. Tonic inhibition in mouse hippocampal CA1 pyramidal neurons is mediated by alpha5 subunit-containing gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 3662–3667. [[CrossRef](#)]
50. Glykys, J.; Mody, I. Hippocampal network hyperactivity after selective reduction of tonic inhibition in GABA A receptor alpha5 subunit-deficient mice. *J. Neurophysiol.* **2006**, *95*, 2796–2807. [[CrossRef](#)]
51. Glykys, J.; Mody, I. The main source of ambient GABA responsible for tonic inhibition in the mouse hippocampus. *J. Physiol.* **2007**, *582*, 1163–1178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Scimemi, A.; Semyanov, A.; Sperk, G.; Kullmann, D.M.; Walker, M.C. Multiple and plastic receptors mediate tonic GABAA receptor currents in the hippocampus. *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 10016–10024. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Glykys, J.; Mann, E.O.; Mody, I. Which GABA(A) receptor subunits are necessary for tonic inhibition in the hippocampus? *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 1421–1426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Dembitskaya, Y.; Wu, Y.W.; Semyanov, A. Tonic GABA(A) Conductance Favors Spike-Timing-Dependent over Theta-Burst-Induced Long-Term Potentiation in the Hippocampus. *J. Neurosci.* **2020**, *40*, 4266–4276. [[CrossRef](#)]
55. Martin, L.J.; Zurek, A.A.; MacDonald, J.F.; Roder, J.C.; Jackson, M.F.; Orser, B.A. Alpha5GABAA receptor activity sets the threshold for long-term potentiation and constrains hippocampus-dependent memory. *J. Neurosci.* **2010**, *30*, 5269–5282. [[CrossRef](#)]
56. Kneussel, M.; Brandstätter, J.H.; Laube, B.; Stahl, S.; Müller, U.; Betz, H. Loss of postsynaptic GABA_A receptor clustering in gephyrin-deficient mice. *J. Neurosci.* **1999**, *19*, 9289–9297. [[CrossRef](#)]
57. Kneussel, M.; Loeblich, S. Trafficking and synaptic anchoring of ionotropic inhibitory neurotransmitter receptors. *Biol. Cell* **2007**, *99*, 297–309. [[CrossRef](#)]
58. Zonouzi, M.; Scafidi, J.; Li, P.; McEllin, B.; Edwards, J.; Dupree, J.L.; Harvey, L.; Sun, D.; Hubner, C.A.; Cull-Candy, S.G.; et al. GABAergic regulation of cerebellar NG2 cell development is altered in perinatal white matter injury. *Nat. Neurosci.* **2015**, *18*, 674–682. [[CrossRef](#)]
59. Benamer, N.; Vidal, M.; Balia, M.; Angulo, M.C. Myelination of parvalbumin interneurons shapes the function of cortical sensory inhibitory circuits. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 5151. [[CrossRef](#)]

60. Oh, W.C.; Lutz, S.; Castillo, P.E.; Kwon, H.B. De novo synaptogenesis induced by GABA in the developing mouse cortex. *Science* **2016**, *353*, 1037–1040. [[CrossRef](#)]
61. Gibson, E.M.; Purger, D.; Mount, C.W.; Goldstein, A.K.; Lin, G.L.; Wood, L.S.; Inema, I.; Miller, S.E.; Bieri, G.; Zuchero, J.B.; et al. Neuronal activity promotes oligodendrogenesis and adaptive myelination in the mammalian brain. *Science* **2014**, *344*, 1252304. [[CrossRef](#)]
62. Seifert, G.; Rehn, L.; Weber, M.; Steinhäuser, C. AMPA receptor subunits expressed by single astrocytes in the juvenile mouse hippocampus. *Mol. Brain Res.* **1997**, *47*, 286–294. [[CrossRef](#)]
63. 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. [[CrossRef](#)]
64. Deshpande, T.; Li, T.; Herde, M.K.; Becker, A.; Vatter, H.; Schwarz, M.K.; Henneberger, C.; Steinhäuser, C.; Bedner, P. Subcellular reorganization and altered phosphorylation of the astrocytic gap junction protein connexin43 in human and experimental temporal lobe epilepsy. *Glia* **2017**, *65*, 1809–1820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Asano, S.M.; Gao, R.; Wassie, A.T.; Tillberg, P.W.; Chen, F.; Boyden, E.S. Expansion Microscopy: Protocols for Imaging Proteins and RNA in Cells and Tissues. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **2018**, *80*, e56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Herde, M.K.; Bohmbach, K.; Domingos, C.; Vana, N.; Komorowska-Müller, J.A.; Passlick, S.; Schwarz, I.; Jackson, C.J.; Dietrich, D.; Schwarz, M.K.; et al. Local efficacy of glutamate uptake decreases with synapse size. *Cell Rep.* **2020**, *32*, 108182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.