



UNIWERSYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Katedra i Zakład Biofizyki i Neurobiologii

Marcin Wyroślak

**„Badanie mechanizmów plastyczności transmisji GABAergicznej w
interneuronach i komórkach piramidowych hipokampa myszy”**

Praca doktorska przygotowana pod kierunkiem

Prof. dr hab. Jerzego W. Mozrzymasa

Wrocław, 2023

Niniejsza rozprawa doktorska stanowi cykl dwóch publikacji naukowych opisujących badania zrealizowane w Katedrze i Zakładzie Biofizyki i Neurobiologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

Badania zostały przeprowadzone w ramach grantu przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki:

- OPUS pt. „Badanie mechanizmów plastyczności transmisji GABAergiczej w interneuronach i komórkach piramidowych hipokampa myszy” nr grantu: 2018/31/B/NZ4/01998

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE	5
ABSTRACT	7
WPROWADZENIE	9
1. Hamowanie toniczne i fazowe transmisji GABAergicznej	9
2. Transmisja GABAergiczna w sieci neuronalnej hipokampa	10
3. Plastyczność hamującej transmisji GABAergicznej	11
4. Hamowanie toniczne w uczeniu się i pamięci	14
CELE I ZAŁOŻENIA PRACY	15
MATERIAŁY I METODY	17
1. Podstawowe odczynniki i roztwory	17
2. Zwierzęta	18
3. Preparatyka skrawków mózgowych myszy	18
4. Doświadczenia elektrofizjologiczne	19
5. Analiza statystyczna	29
WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ	30
PUBLIKACJE	31
<i>“Induction of Inhibitory Synaptic Plasticity Enhances Tonic Current by Increasing the Content of α5-Subunit Containing GABAA Receptors in Hippocampal Pyramidal Neurons”</i>	31
<i>“Bidirectional plasticity of GABAergic tonic inhibition in hippocampal somatostatin- and parvalbumin-containing interneurons”</i>	40
PODSUMOWANIE I WNIOSKI	53
BIBLIOGRAFIA	56
WYKAZ RYCIN	64
ZAŁĄCZNIKI	65

STRESZCZENIE

Jedną z kluczowych funkcji poprawnie funkcjonującego mózgu jest zdolność do morfologicznych i funkcjonalnych zmian tkanki nerwowej, zwana neuroplastycznością. W ostatnich latach, szczególną uwagę zyskały badania nad transmisją hamującą, a w szczególności nad jej plastycznym komponentem. Transmisja GABAergiczna jest krytyczna dla utrzymania balansu pomiędzy transmisjami pobudzającą i hamującą, odgrywając zasadniczą rolę w wielu kognitywnych procesach, w tym w procesach uczenia się czy tworzenia pamięci. Transmisję ta dzieli się na dwie główne składowe: transmisję fazową oraz toniczną. Podczas gdy przewodzenie fazowe mediowane jest przez receptory GABA_A znajdujące się w synapsach, hamowanie toniczne zależne jest od receptorów znajdujących się w poza synapsami. Poza synapsą, neuroprzekaźnik GABA obecny jest w niskich, submikromolarnych stężeniach, aktywując ekstrasynaptyczne, charakteryzujące się wysokim powinowactwem do GABA, receptory GABA_A, powodując ich trwałe przewodzenie. W zależności od typu komórki, ekstrasynaptyczne prądy toniczne w hipokampie mogą być mediowane przez receptory GABA_A z różnorodnym składem podjednostkowym, jednak to receptory GABA_A zawierające w swoim składzie podjednostkę $\alpha 5$ lub δ uważa się za dominujące w tym procesie. Badania wskazują, że pozasynaptyczne receptory GABA_A mogą odgrywać kluczową rolę w uczeniu się i w kształtowaniu pamięci zależnej od hipokampa. Co więcej, coraz więcej dowodów naukowych wskazuje, że nie tylko pobudzająca, ale i hamująca transmisja GABAergiczna podlega plastycznym zmianom zachodzącym w mózgu podczas różnych procesów poznawczych. Naturalne wydaje się więc pytanie, czy poza transmisją synaptyczną, również transmisja toniczna może być objęta zmianami plastycznymi. Mimo, że dotychczas głównym obiektem badań w regionie CA1 hipokampa były komórki piramidowe, to jednak zauważalnie rośnie zainteresowanie zbadaniem zjawisk plastycznych zachodzących przy udziale interneuronów. Spośród wielu typów hipokampalnych interneuronów mających swoje zakończenia aksonalne na błonach komórek piramidowych oraz innych interneuronach, dwa z nich są szczególnie interesujące – interneurony charakteryzujące się syntezą białka parwalbuminy (PV+ INs) oraz te, które syntezują białko somatostatynę (SST+ INs). Dobrze opisano ich fundamentalny wpływ na regulację dynamiki działania sieci neuronalnej w hipokampie, jak również na konsolidację pamięci. W niniejszej rozprawie doktorskiej podjęto próbę zbadania, czy hamowanie toniczne może być zjawiskiem plastycznym. Zastosowanie modelu plastyczności transmisji

GABAergicznej zależnej od receptorów NMDA, myszy transgeniczných oraz myszy typu dzikiego pozwoliło nam opisać zależne od typu komórki zmiany plastyczne, jakim podlega hamowanie toniczne. Ponadto, określono zmiany w udziale receptorów GABA_A z podjednostką $\alpha 5$ lub δ w mediowaniu prądów tonicznych po indukcji plastyczności. Wykazano, że zmiany plastyczne w wykorzystywanym modelu wiążą się ze znacznym wzrostem prądu tonicznego w komórkach piramidowych hipokampa. Co więcej, efekt ten był skorelowany ze zwiększonym udziałem pozasynaptycznych receptorów $\alpha 5$ GABA_A, podczas gdy pula receptorów z podjednostką δ nie została naruszona. Badania nad wspomnianymi wyżej interneuronami ukazały jednak bardziej skomplikowany obraz neuroplastyczności. W tym przypadku wykazano dwukierunkową plastyczność hamowania tonicznego zależnego od typu komórki. Podobnie jak w przypadku komórek piramidowych interneurony zawierające białko somatostatynę charakteryzowały się znacznym wzmocnieniem tonicznego prądu GABAergicznego, a zmiany te były zależne od zwiększenia populacji receptorów $\alpha 5$ GABA_A. Odmienne wyniki uzyskano w przypadku badań nad interneuronami zawierający parwalbuminę. Zarówno interneurony generujące krótkotrwałe potencjały czynnościowe o wysokiej częstotliwości (fast-spiking PV+ INs), ale i interneurony, których wzorzec wyładowań wskazywał na niższą częstotliwość długotrwałych wyładowań (non-fast spiking PV+ INs) wykazywały istotne zmniejszenie pozasynaptycznych prądów tonicznych po indukcji plastyczności. Obserwowanemu efektowi towarzyszył znacząco zmniejszony udział receptorów δ GABA_A, ale i niewielki wzrost udziału prądów zależnych od $\alpha 5$ GABA_A. Wyniki te wskazują, że plastyczność hamowania tonicznego jest nowym wymiarem neuroplastyczności, a mechanizmy leżące u jej podstaw zależą od typu neuronów, a także równowagi w udziale receptorów GABA_A zawierających podjednostki $\alpha 5$ oraz δ . Podsumowując, badania te dostarczają solidnych dowodów na kluczową rolę ekstrasyneptycznych receptorów GABA_A w modulacji transmisji hamującej oraz ich wpływ na działanie sieci neuronalnych.

ABSTRACT

One of the essential functions of a properly functioning brain is the ability to morphological and functional changes of neural tissue, called neuroplasticity. In recent years inhibitory transmission, the process by which neurons suppress or reduce the activity of other neurons gained a remarkable attention. Inhibitory transmission, with its main neurotransmitter GABA, is critical in maintaining the balance between excitation and inhibition in the brain, and is believed to play a key role in a wide range of brain functions, including learning, memory and behavior. The inhibitory GABAergic transmission has two major components: tonic and phasic. While phasic signalling is mediated by GABA_A receptors at postsynaptic densities, tonic inhibition relies on high affinity receptors located at extrasynaptic regions. Ambient GABA, present in low, submicromolar concentrations, are able to activate extrasynaptic GABA_A receptors leading to their persistent conductance. Depending on the cell type, tonic currents in hippocampus can be mediated by a variety of GABA_A receptor subtypes, but $\alpha 5$ and δ subunits are considered to be predominant. It has been demonstrated that extrasynaptic $\alpha 5$ - and δ -containing GABA_A may play a crucial role in learning and memory formation dependent on the hippocampus. Recently, a growing body of evidence indicates that not only excitatory, but also inhibitory synaptic transmission undergoes plastic changes occurring in the brain during a variety of cognitive tasks. It seems natural, therefore, to ask whether, not only phasic inhibition, but also tonic inhibition could be affected by plastic changes. While the main objects of studies in the hippocampal CA1 region are principal cells, it is thus appealing to investigate the plasticity in interneurons. Two of the different types of interneurons exhibit a large diversity in innervating pattern of the principal cells and of other interneurons - parvalbumin-containing (PV+ INs) and somatostatin-containing (SST+ INs) interneurons. It is described that both of them are crucial in regulating the hippocampal neuronal network dynamics, having a substantial impact on memory consolidation. Herein, we made an attempt to investigate whether the tonic inhibition could be a plastic phenomenon. Use of the NMDAR-dependent GABAergic plasticity model, wild-type and transgenic mice allowed us to describe the cell type-dependent plastic changes that tonic inhibition undergoes. Furthermore, we defined the shifts in the participation of $\alpha 5$ - and δ -containing GABA_A in tonic currents after induction of plasticity. We reported that induction of plasticity is associated with a significant increase in tonic current in principal cells. Moreover, this effect was correlated with an increased

proportion of extrasynaptic $\alpha 5$ -GABA_A receptors, while the pool of δ -GABA_A receptors was not affected. Interestingly, research on inhibitory interneurons has shown a bidirectional plasticity of tonic inhibition. Somatostatin-containing interneurons were characterized with enhancement of GABAergic tonic current and these changes were dependent on increase of $\alpha 5$ GABA_ARs population extrasynaptically. Different results were obtained, when parvalbumin-containing interneurons were examined. Both fast-spiking and non-fast spiking PV⁺ interneurons showed a reduction of extrasynaptic tonic currents after the plasticity induction. The observed effect was accompanied by a remarkably reduced proportion of δ GABA_ARs and a relatively small increase of participation in tonic currents mediated by $\alpha 5$ GABA_ARs. We conclude that plasticity of tonic inhibition is a novel dimension of the inhibitory neuroplasticity and the underlying mechanisms depend on the cell-specific balance in participation of $\alpha 5$ and δ subunit-containing GABA_A receptors. In conclusion, our research provides a solid evidence for the crucial role of extrasynaptic GABA_A receptors in modulating inhibitory transmission and their impact on the function of neuronal networks.

WPROWADZENIE

1. Hamowanie toniczne i fazowe transmisji GABAergicznej

Równowaga pomiędzy pobudzeniem a hamowaniem aktywności układu nerwowego ssaków jest niezwykle ważnym i złożonym zjawiskiem. Jedną z jej składowych jest transmisja GABAergiczna, która w mózgach dorosłych ssaków odgrywa kluczową rolę w hamowaniu. Kwas γ -aminomasłowy (GABA) aktywuje białka receptorowe biorące udział w transporcie jonów przez błonę komórkową, a ich aktywność jest fundamentalna dla regulacji pobudliwości komórek nerwowych, a idąc dalej, dla aktywności sieci neuronalnej. Jonotropowe receptory GABA_A, jako kanały pentameryczne, charakteryzują się dużą różnorodnością funkcjonalną, wynikającą z występowania 19 typów podjednostek ($\alpha_1 - 6$, $\beta_1 - 3$, $\gamma_1 - 3$, δ , ϵ , θ , π , $\rho_1 - 3$) mogących wchodzić w skład receptora (McKernan and Whiting, 1996; Sieghart, 2000; Sieghart and Savić, 2018). Transmisja GABAergiczna składa się z dwóch głównych komponentów: transmisji synaptycznej oraz tonicznej (pozasynaptycznej). Receptory GABA_A o składzie podjednostkowym $\alpha_1\beta\gamma_2$, $\alpha_2\beta\gamma_2$ oraz $\alpha_3\beta\gamma_2$ występują przeważnie w synapsach, uczestnicząc w szybkim przewodzeniu fazowym. Ich aktywność zależna jest od szybkich i relatywnie dużych zmian stężenia neuroprzekaźnika GABA w synapsach. Jednak receptory GABA_A mogą znajdować się również poza synapsami, biorąc udział w hamowaniu tonicznym. Ze względu na niskie, submikromolarne stężenie GABA okołosynaptycznie, hamowanie toniczne opiera się ono na receptorach GABA_A o wysokim powinowactwie. Te niskie stężenia GABA są w stanie aktywować pozasynaptyczne receptory GABA_A powodując ich trwałe przewodnictwo. Receptory zaangażowane w hamowanie toniczne zazwyczaj zawierają podjednostki $\alpha(4-6)$, β , δ (dla $\alpha(4/6)$) lub γ (dla $\alpha(5)$), jednak należy wziąć pod uwagę fakt, że różne typy neuronów w różnych regionach mózgu mogą różnić się stechiometrią podjednostek wchodzących w skład tych receptorów (Mody and Pearce, 2004; Glykys and Mody, 2007a; Chen et al., 2017).

Przewodnictwo toniczne działa w dłuższej skali czasowej, mając prominentny wpływ na obniżenie pobudliwości błony neuronu. Ze względu na większą ilość receptorów GABA_A o wysokim powinowactwie (a więc tymi zlokalizowanymi pozasynaptycznie) oraz nawet 3-krotnie większym ładunkiem przenoszonym w ramach uśrednionego w odpowiedniej skali czasowej

tonicznego prądu GABAergicznego, uważa się, że prąd toniczny jest nierozzerwalnym elementem równowagi pomiędzy hamowaniem a pobudzeniem w mózgu (Farrant and Nusser, 2005).

Szczególnie ciekawym wydaje się być wątek receptorów GABA_A mających w swoim składzie podjednostkę $\alpha 5$. Mimo, że receptory tego typu stanowią mniej niż 5% całej populacji receptorów GABA_A w mózgu ssaków, odkryto prawie dwie dekady temu, że odpowiadają za zdecydowaną większość przewodnictwa tonicznego w komórkach piramidowych regionów CA3/CA1 hipokampa. Tym samym, zwraca się uwagę na relatywnie niski udział receptorów GABA_A z podjednostką δ oraz receptorów złożonych wyłącznie z podjednostek α oraz β (Caraiscos et al., 2004). Artykuły naukowe zaprezentowane w niniejszej pracy doktorskiej rozszerzają znacznie poziom wiedzy na temat przewodnictwa tonicznego w hipokampie nie tylko w odniesieniu do pobudzających komórek piramidowych, ale również różnych typów interneuronów hamujących. Ponadto, co zostało opisane w dalszej części, udowodniono, że prądy toniczne podlegają zmianom plastycznym, które mogą znacząco wpływać na sieć neuronalną.

2. Transmisja GABAergiczna w sieci neuronalnej hipokampa

W hipokampie, strukturze nierozzerwalnie związanej z uczeniem się i pamięcią, hamujące interneurony GABAergiczne stanowią około 10-15% ogólnej populacji neuronów. Jednak, mimo tak małego udziału procentowego, populacja interneuronów hipokampa charakteryzuje się wielką różnorodnością, będąc główną determinantą praktycznie wszystkich aspektów funkcji obwodów neuronalnych (Pelkey et al., 2017). Anatomicznie, hipokamp podzielony jest na równoległe ułożone warstwy. Komórki piramidowe, które uznawane są za przykład komórek pobudzających w hipokampie, swoje ciała komórkowe zlokalizowane mają w stratum pyramidale, a ich dendryty rozciągają się na wszystkie z warstw hipokampa. Taka organizacja dendrytów komórek piramidowych pozwala na stymulację z różnych źródeł, zarówno zewnątrz-, jako wewnątrz-hipokampalnych. W przeciwieństwie do komórek piramidowych mających swoje ciała komórkowe w stratum pyramidale, hamujące interneurony, które z definicji uwalniają neuroprzebieżnik GABA, swoje ciała komórkowe mają rozproszone we wszystkich warstwach hipokampa (Booker and Vida, 2018). Układ ich drzew dendrytycznych oraz aksonów jest bardziej ograniczony, co pozwala na bardziej specyficzną integrację impulsów aferentnych czy eferentnych.

Aksony niektórych podtypów interneuronów mogą pozostawać w tej samej warstwie co ciała komórkowe, jednak niektóre interneurony charakteryzują się aksonami, które pokonują znaczne odległości, tworząc projekcje znacznie oddalone od ich ciał komórkowych. Aksony interneuronów hamujących mogą docierać do dobrze zdefiniowanych domen postsynaptycznych (w przypadku hipokampa – ciała komórkowego i dendrytów bliższych komórek piramidowych) lub dostarczać sygnały do znacznie oddalonych, dużych fragmentów dendrytu komórek docelowych (Klausberger and Somogyi, 2008). Taki rozkład włókien aferentnych zapewnia, że praktycznie cała powierzchnia komórek piramidowych otrzymuje stymulację od różnych podtypów interneuronów GABAergicznyc. Poprzez swoją aktywność, interneurony pełnią kluczową rolę nie tylko w regulacji pobudliwości pojedynczych komórek, ale również biorą udział w ustalaniu okna czasowego dla pobudzenia synaptycznego, a co za tym idzie – kolejnej inicjacji potencjału czynnościowego. Proces ten ma istotny wpływ na kształtowanie i synchronizację przepływu informacji w obwodach neuronalnych (Park et al., 2020; Udakis et al., 2020; Brzdąk et al., 2023).

3. Plastyczność hamującej transmisji GABAergicznej

Poprzez termin „plastyczności synaptycznej” definiuje się zmiany siły synaps lub zmiany wydajności transmisji synaptycznej, która wynika jako odpowiedź na określone bodźce i jest odpowiedzią na aktywność sieci neuronalnej (Voss et al., 2017). Zmiany plastyczne dotyczą zarówno morfologii, jak i fizjologii komórek neuronalnych, a trwać mogą od kilku milisekund aż po okres liczony w latach. Uważa się, że plastyczność synaptyczna stanowi fundamentalny substrat procesów pamięciowych i uczenia się (Abraham et al., 2019; Chiu et al., 2019; Barberis, 2020). Od kilku dekad intensywnie badana jest plastyczność synaps pobudzających (glutaminianergicznyc), której molekularne mechanizmy udało się już częściowo poznać i opisać. Dużo mniej uwagi naukowcy poświęcali badaniom nad hamującą transmisją GABAergiczną ze względu na zdecydowanie mniejszą liczbę neuronów GABAergicznyc oraz ich dużo większe zróżnicowanie, co utrudniało badanie ich potencjału do zmian plastycznych (Klausberger and Somogyi, 2008; Pelkey et al., 2017). W ostatnich latach obserwujemy jednak znaczny wzrost zainteresowania tematyką transmisji hamującej, a odkrycie, że synapsy hamujące, tak jak pobudzające, podlegają zmianom plastycznym, tworzy przestrzeń do wielu przełomowych odkryć.

Badania wskazują, że chroniczna modyfikacja pobudliwości neuronów, może wpływać zarówno na synapsy glutaminianergiczne oraz GABAergiczne na tym neuronie. Wskazuje to na udział mechanizmów komórkowych, zaangażowanych w koordynację zmian synaptycznych (Turrigiano, 1999; Iyata et al., 2008; Rannals and Kapur, 2011). Dokładny związek między aktywnością neuronalną, a jednoczesnymi modyfikacjami transmisji glutaminianergicznej oraz GABAergicznej jest słabo poznany. Wynikać to może z faktu, że efekty różnych protokołów wykorzystywanych do indukcji plastyczności, były głównie badane niezależnie w synapsach pobudzających i hamujących. Warto jednak zwrócić uwagę, że ekspresja plastyczności pobudzającej i hamującej wykazują kilka wspólnych cech, głównie postsynaptycznie. W obu przypadkach dochodzi do aktywacji postsynaptycznych receptorów NMDA oraz CaMKII (ang. Ca^{2+} /calmodulin kinase II) – jednego z najlepiej scharakteryzowanych szlaków sygnalizacyjnych w długotrwałym wzmocnieniu synaptycznym (LTP od ang. „*Long-Term Potentiation*” dla transmisji pobudzającej oraz iLTP od ang. „*Inhibitory Long-Term Potentiation*” dla transmisji hamującej). Wiele badań wskazuje na fakt, iż aktywacja NMDA i CaMKII jest niezbędna dla ekspresji długotrwałych zmian synaptycznych (Marsden et al., 2007; Nicoll and Roche, 2013; Petrini et al., 2014; Flores et al., 2015; He et al., 2015; Chiu et al., 2018). Ponadto, długotrwałe osłabienie synaptyczne transmisji GABAergicznej (iLTD od ang. „*Inhibitory Long-Term Depression*”) opiera się na aktywności kalcyneuryny, fosfatazy, która jest ściśle powiązana w długotrwałe osłabienie glutaminianergiczne (LTD od ang. „*Long-Term Depression*”) (Mulkey et al., 1994; Lu et al., 2000). Zaobserwowano również, że działanie proteolityczne kalpain wpływa zarówno na plastyczność synaptyczną glutaminergiczną, jak i GABAergiczną (Andres et al., 2013; Tyagarajan et al., 2013; Costa et al., 2016; Briz and Baudry, 2017). Bardzo istotnym, z punktu widzenia niniejszej pracy doktorskiej, jest fakt, że indukcja plastyczności obejmuje zmiany liczby receptorów synaptycznych, dyfuzję lateralną oraz ich interakcję z cytoszkieletem w obu rodzajach transmisji (Bannai et al., 2009; Choquet and Triller, 2013; Petrini et al., 2014). Co więcej, synapsy hamujące często znajdują się bardzo blisko synaps glutaminianergicznych (nawet kilka mikrometrów odległości) (Megias et al., 2001). Zatem, przedstawione analogiczne mechanizmy plastyczności postsynaptycznej oraz przestrzenny układ synaps obu transmisji stanowią mocne argumenty w dyskusji nad możliwą interakcją między sąsiadującymi synapsami glutaminianergicznymi i GABAergicznymi.

Jak zostało wspomniane wcześniej, hamujące prądy toniczne mają kluczowy wpływ na kształtowanie pobudliwości sieci neuronalnej w hipokampie. Dotychczas niewiele badań

przeprowadzono na temat zjawisk plastycznych w odniesieniu do receptorów GABA_A znajdujących się około- i pozasynaptycznie, zaangażowanych w mediowanie prądów tonicznych. W zależności od regionu mózgu, GABAergiczny prąd toniczny może być mediowany przez różne kompozycje receptora GABA_A (Semyanov et al., 2003; Farrant and Nusser, 2005), jednak na potrzeby niniejszej pracy doktorskiej, skupiono się na strukturze hipokampa. Badania wskazują, że w zakręcie zębatym receptory GABA_A z podjednostką δ są zaangażowane w mediowanie prądów tonicznych (Pirker, 2000; Nusser and Mody, 2002; Stell and Mody, 2002), podczas gdy w komórkach piramidowych regionów CA1/CA3 hipokampa tę funkcję pełnią receptory GABA_A z podjednostką $\alpha 5$ (Caraiscos et al., 2004; Glykys and Mody, 2007b; Wyroślak et al., 2021). W niniejszej pracy doktorskiej do stanu wiedzy na temat GABAergicznych prądów tonicznych w hipokampie dostarczamy dowodów, że w badanych typach interneuronów (PV+ oraz SST+) konduktancja ta jest zależna głównie od δ GABA_A (Wyroślak et al., 2023)

Receptory GABA_A w synapsach GABAergicznych zakotwiczone są głównie dzięki klastrom gefiryny (Essrich et al., 1998; Kneussel and Betz, 2000; Jacob et al., 2008; Vithlani et al., 2011), jednak nie zawsze jest to regułą – opisano już niezależne od gefiryny procesy tworzenia klastrow receptorów GABA_A w synapsach (Papadopoulos et al., 2007; Saiepour et al., 2010; Panzanelli et al., 2011). Warto zauważyć, że w warunkach fizjologicznych, gefiryna może wpływać na lateralną ruchliwość receptorów GABA_A w synapsach, co wykazano poprzez zaburzenie aktywności gefiryny (Jacob et al., 2008). Receptory GABA_A z podjednostką $\alpha 5$ koncentrują się głównie poza synapsami, a ich kotwiczenie w cytoszkieletcie aktynowym zachodzi dzięki białku z rodziny ERM - radyksynie. Specyficzne kotwiczenie receptorów $\alpha 5$ GABA_A przez radyksynę wymaga dwustopniowego procesu aktywacji, mediowanego przez związanie z błoną komórkową oraz zależne od ufosforylowania zmiany konformacyjne radyksyny. Uważa się, że proces ten jest zależny od sygnalizacji RhoA i ROCK (Matsui et al., 1998) Zdefosforylowanie radyksyny prowadzi do zwiększenia ruchliwości lateralnej receptorów GABA_A z podjednostką $\alpha 5$, tym samym zwiększają ich liczbę w synapsach GABAergicznych. Zatem zwiększona zostaje pula receptorów $\alpha 5$ GABA_A, które mają swój udział w mediowaniu prądów synaptycznych, a w konsekwencji ma to wpływ na siłę synaps. Wiadomym jest, że udział tych receptorów ma bardzo duży wpływ na efektywność synaps hamujących poprzez udział w prądach synaptycznych o wolniejszej kinetyce (Schulz et al., 2018; Brzdąk et al., 2023). Jak wykazano, receptory $\alpha 5$ GABA_A są jednym z kluczowych elementów wpływających na przedstawianą wcześniej interakcję

transmisji glutaminianergicznej oraz GABAergicznej. W wyniku indukcji długotrwałego wzmocnienia synaps glutaminianergicznych, następuje relokacja receptorów $\alpha 5$ GABA_A do synaps hamujących, co powoduje zablokowanie dalszej aktywacji receptorów NMDA, niezbędnej do dalszego wzrostu efektu indukcji plastyczności w synapsach pobudzających. W rezultacie, hamująca plastyczność synaptyczna zachodzi równolegle z plastycznością synaps pobudzających, mając wpływ na kształtowanie się bardziej zaawansowanych procesów, takich jak np. uczenie się i pamięć (Davenport et al., 2021).

Tak jak zostało wspomniane, indukcja plastyczności synaptycznej wywołuje redystrybucję receptorów ekstrasynaptycznych, a więc pozostaje odpowiedzieć na pytanie, jak te procesy wpływają na prądy toniczne. W niniejszej pracy doktorskiej podjęto się próby określenia wpływu indukcji plastyczności na populacje receptorów GABA_A z podjednostką $\alpha 5$ lub δ w komórkach piramidowych oraz różnych typach interneuronów hipokampa, które to populacje okazują się podlegać procesom plastycznym, a zmiany te są specyficzne dla typu komórki.

4. Hamowanie toniczne w uczeniu się i pamięci.

Rosnąca w ostatnich latach liczba badań dotycząca transmisji GABAergicznej dostarcza co raz większej liczby dowodów, że hamowanie toniczne odgrywa bardzo istotną rolę w zależnych od hipokampa procesach uczenia się i pamięci. Eksperymenty, w których wykorzystano myszy z nokautem *Gabra5*(-/-), które charakteryzują się brakiem ekspresji receptorów $\alpha 5$ GABA_A, zaangażowanych w przewodnictwo toniczne, wykazują przyspieszenie uczenia się (Martin 2009). Myszy z częściowym lub pełnym deficytem receptorów $\alpha 5$ GABA_A wykazują lepsze wyniki w uczeniu asocjacyjnym oraz testach pamięci (Collinson et al., 2002; Crestani et al., 2002; Yee et al., 2004), charakteryzując się również lekkim pogorszeniem się uczenia związanego z lokalizacją obiektów (Prut et al., 2010). Zablokowanie aktywności tych receptorów poprzez aplikację blokerów ich aktywności (np. L-655,708, RO-493851) również wpływa pozytywnie na uczenie się i zdolności poznawcze (Navarro et al., 2002; Ballard et al., 2009; R. Atack, 2011). U ludzi przeprowadzono dotychczas niewiele podobnych badań, jednak istnieją dowody, że podanie blokerów $\alpha 5$ GABA_A u zdrowych osób redukuje zaburzenia kognitywne związane z amnezją alkoholową (Nutt et al., 2007). Poczyniono również kroki w celu odpowiedzenia na pytanie, w jakim stopniu prąd toniczny zależny GABA_A z podjednostką δ wpływa na procesy uczenia się i

pamięci w mózgu. Obserwuje się mutacje w genie odpowiedzialnym za ekspresję podjednostki δ receptora GABA_A u myszy w modelu epilepsji oraz u pacjentów chorych na epilepsję (Hirose, 2014; Mele et al., 2019). Ponadto, niedawno opublikowane badania wykazują na zmniejszenie ekspresji wielu podjednostek receptora GABA_A, w tym podjednostki δ , w zakręcie skroniowym środkowym w próbkach mózgu pobranych po śmierci od pacjentów z chorobą Alzheimera. Zmiany zaburzają równowagę pomiędzy transmisją pobudzającą a hamującą, co może prowadzić do dysfunkcji poznawczych opisywanych w chorobie Alzheimera (Govindpani et al., 2020). Receptory GABA_A z podjednostką δ występują w hipokampie, chociaż ich ekspresja zależy od typu komórki nerwowej (Sun et al., 2004; Mangan et al., 2005; Glykys et al., 2008). Wykazano, że te receptory niezbędne dla procesów uczenia się i tworzenia pamięci, a wzmocnienie transmisji tonicznej zależnej od δ GABA_A w hipokampie spowodowało drastyczne pogorszenie się zdolności uczenia się zwierząt. Udowodniono również, że wzmożona aktywność tych receptorów blokuje indukcję plastyczności synaptycznej, która leży u podstaw procesów uczenia się (Whissell et al., 2013; Cushman et al., 2014). Podsumowując, wraz z rosnącym stanem wiedzy na temat wpływu transmisji GABAergicznej na sieć neuronalną, dowiadujemy się więcej na temat nie tylko molekularnych mechanizmów neuroplastyczności, procesów uczenia się i pamięci, ale również podstaw zaburzeń neurologicznych.

CELE I ZAŁOŻENIA PRACY

Podstawę niniejszej pracy doktorskiej stanowią spójne tematycznie publikacje naukowe realizowane w celu pogłębienia wiedzy z zakresu tytułowego zagadnienia: *Badania mechanizmów plastyczności transmisji GABAergicznej w interneuronach i komórkach piramidowych hipokampa myszy*. W ramach realizacji zadań projektów badawczych, przeprowadzono weryfikację niniejszych hipotez badawczych:

1. Indukcja iLTP wpływa na ekstrasynaptyczne prądy toniczne w komórkach piramidowych regionu CA1 hipokampa myszy.

2. Interneurony hipokampa myszy z regionu CA1 charakteryzują się plastycznością transmisji GABAergiczej zależną od aktywności integrzyn oraz typu komórki.
3. Podanie NMDA w różnych typach interneuronów regionu CA1 hipokampa myszy powoduje zmniejszenie amplitudy miniaturowych hamujących prądów postsynaptycznych oraz wpływa na ekstrasynaptyczne prądy toniczne.

Celem pierwszej publikacji z cyklu, zatytułowanej: „Induction of Inhibitory Synaptic Plasticity Enhances Tonic Current by Increasing the Content of $\alpha 5$ -Subunit Containing GABAA Receptors in Hippocampal Pyramidal Neurons” (Neuroscience 15;467:39-46), była weryfikacja pierwszej z hipotez dotyczącej potencjalnego wpływu indukcji iLTP na prądy ekstrasynaptyczne w komórkach piramidowych hipokampa myszy. Ponadto, w pracy tej rozróznilo udział populacji receptorów GABAA z podjednostkami $\alpha 5$ oraz δ w mediowaniu prądów tonicznych oraz zmiany plastyczne, którym podlegają.

Celem drugiej publikacji zatytułowanej „Bidirectional plasticity of GABAergic tonic inhibition in hippocampal somatostatin- and parvalbumin-containing interneurons” (Frontiers in Cellular Neuroscience 17:1193383) było odniesienie się do hipotez drugiej i trzeciej poprzez weryfikację wpływu indukcji iLTP poprzez podanie NMDA na prądy toniczne mediowane przez ekstrasynaptyczne receptory GABAA. Co więcej, dzięki użyciu bardzo specyficznej wobec konkretnych receptorów farmakologii, opisane zostały zmiany udział w mediowaniu prądów tonicznych przez receptory GABAA z podjednostkami $\alpha 5$ oraz δ . Tematyka plastyczności transmisji GABAergiczej zależnej od aktywności integrzyn została poruszona w oryginalnej pracy, która nie została włączona do niniejszej rozprawy doktorskiej (Brzdak P., Lebida K., **Wyroslak M.**, Mozrzymas JW. GABAergic synapses onto SST and PV interneurons in the CA1 hippocampal region show cell-specific and integrin-dependent plasticity. Scientific Reports (2023) 13:5079).

MATERIAŁY I METODY

1. Podstawowe odczynniki i roztwory

1.1. Odczynniki

Odczynniki wykorzystane w badaniach przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej pochodziły z firmy Sigma-Aldrich (Polska). Poniżej przedstawiono wyjątki, zakupione w Tocris Bioscience (Wielka Brytania):

- Tetrodotoksyna
- DNQX (sól dwusodowa)
- Etomidat
- Gaboxadol
- L-655,708
- Pikrotoksyna

1.2. Roztwory

- W trakcie preparowania oraz inkubacji skrawków mózgowych myszy, a także podczas pomiarów elektrofizjologicznych wykorzystano sztuczny płyn mózgowo-rdzeniowy (ang. artificial cerebrospinal fluid, aCSF) (Feldman, 2000). Poniżej skład w mM:
NaCl 119, KCl 2.5, NaH₂PO₄ 1, NaHCO₃ 26.3, MgSO₄ 1.3, CaCl₂ 2.5, glukoza 11. Wartość pH roztworu wynosiła 7.4 (Osmolarność: 295-305 mOsm). Roztwór był natleniany karbogenem (95 % O₂ + 5 % CO₂).
- Roztwór wykorzystywany do wypełniania pipet pomiarowych wykorzystywany w trakcie rejestracji prądów synaptycznych i pozasynaptycznych z komórek piramidowych oraz interneuronów hipokampa myszy (Marsden et al., 2007). Skład roztworu w mM: glukonian potasu 10, KCl 125, EGTA 1, HEPES 10, MgATP 4, sacharoza 5. Wartość pH = 7.25 uzyskiwano poprzez miareczkowanie roztworem 1M KOH (Osmolarność: 285-295 mOsm).

2. Zwierzęta

Zwierzęta wykorzystywane w przedstawionych doświadczeniach pochodziły ze Zwierzętarni Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Zwierzęta utrzymywane były z pełną dostępnością wody oraz pożywienia *ad libitum* w naturalnym trybie 12h światła/12h ciemności. Do przeprowadzenia badań wykorzystano zarówno myszy typu dzikiego C57BL/6 oraz genetycznie modyfikowanych myszy charakteryzujących się biosyntezą reporterowego białka fluorescencyjnego w dwóch typach interneuronów – interneuronach parwalbuminowych (PV+) oraz interneuronach somatostatynowych (SST+). Myszy tego typu rodziły się w wyniku krzyżówki homozygotycznych myszy, u których obserwuje się syntezę rekombinazy Cre (PV-Cre, JAX 017320 oraz SST-Cre, JAX 028864) z myszami, które charakteryzują się obecnością w genomie (zablokowanego dzięki obecności hamujących transkrypcję sekwencji *loxP*) wariantu czerwonego białka fluorescencji tdTomato. Potomstwo z tej krzyżówki cechuje się mocną i trwałą fluorescencją, umożliwiającą identyfikację specyficznej populacji interneuronów.

Zwierzęta były traktowane zgodnie z regulacjami Ustawy o Ochronie Zwierząt, a na przeprowadzenie niniejszych badań uzyskana została zgoda Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach we Wrocławiu.

3. Preparatyka skrawków mózgowych myszy

Myszy wykorzystane w ramach niniejszych badań były znieczulane izofluranem, a następnie uśmiercane poprzez dekapitację. Po dekapitacji, otwierano czaszkę, a mózg umieszczano w zimnym w zimnym (2-3 °C) sztucznym płynie mózgowo rdzeniowym (aCSF) natlenianym za pomocą karbogenu (95% O₂, 5% CO₂) na około 10 sekund (aCSF o pH 7.4 zawierał w mM: NaCl 119, KCl 2.5, NaH₂PO₄ 1, NaHCO₃ 26.3, MgSO₄ 1.3, CaCl₂ 2.5, oraz glukoza 11). Następnie, półkule mózgowe były rozdzielane, a następnie za pomocą wibratomu Leica VT1200S (Leica, Niemcy) pocięte transwersalnie na skrawki o grubości 350 μm. W ten sposób uzyskano wielu skrawków mózgowych, na których hipokamp był łatwo widoczny. Skrawki były następnie przenoszone do komory

inkubacyjnej zawierającej natleniany aCSF o temperaturze pokojowej i pozostawiane tam przez co najmniej 1 godzinę przed rozpoczęciem eksperymentów fizjologicznych.

4. Doświadczenia elektrofizjologiczne

Doświadczenia elektrofizjologiczne wykonane w ramach niniejszej pracy doktorskiej wykonane zostały z użyciem techniki patch-clamp. Poniżej opisuję dokładnie zarówno tę metodę, jak i przebieg doświadczeń. Następnie opisuję sposoby analizy uzyskanych w ramach eksperymentów danych.

W celu przeprowadzenia eksperymentów elektrofizjologicznych, skrawki mózgowie umieszczano w komorze zanurzeniowej, w której zachodził ciągły przepływ natlenianego roztworu aCSF o temperaturze pokojowej. Region CA1 hipokampa uwidaczniany był w małym powiększeniu (Zeiss, 4x), a do wizualizacji poszczególnych neuronów w stratum pyramidale/oriens użyto dużego powiększenia (Zeiss, 40x). Komórki piramidowe rozróżniane były od interneuronów w stratum pyramidale dzięki obecności wyraźnego, grubego wierzchołkowego proksymalnego dendrytu oraz charakterystyki wzorca wyładowań. Zarówno interneurony parwalbuminowe (PV+), jak i somatostytnowe (SST+) lokalizowane były na podstawie biosyntezy białka reporterowego tdTomato, wizualizowanego za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej wyposażonej w system Lambda DG-4, zaprojektowany do szybkich zmian długości fali (Sutter Instrument). Interneuronów parwalbuminowych poszukiwano w stratum pyramidale. Charakteryzowały się względnie dużym ciałem komórki oraz dendrytami znajdującymi się po dwóch przeciwnych stronach somy. Interneurony syntezujące somatostatynę, charakteryzujące się widocznie rozszerzonym drzewem dendrytycznym, lokalizowane były w stratum oriens, równoległe do stratum pyramidale.

Wszystkie eksperymenty przeprowadzone były w technice patch-clamp w konfiguracji whole-cell używając szklanej pipety pomiarowej wypełnionej roztworem elektrodowej (elektrodowym (pH 7.25, 295 MOsm, skład w mM: glukonian potasu 10, KCl 125, EGTA 1, HEPES 10, MgATP 4, sacharoza 5) o oporze 2.5 - 4.5 MOhm. Rejestracja wzorców wyładowań przeprowadzona była w trybie current-clamp metody patch-clamp. Pomiar

prądów tonicznych były przeprowadzone w trybie voltage-clamp przy utrzymywanym potencjale błonowym -70 mV. Sygnały rejestrowane w ramach eksperymentów wzmacniano i filtrowano przy użyciu wzmacniacza Multi-Clamp 700B oraz Axon Digidata 1550 (Molecular Devices).

Po rejestracji wzorca wyładowań, podawano TTX ($1 \mu\text{M}$) w celu zablokowania generowania potencjałów czynnościowych zależnych od bramkowanych napięciem kanałów sodowych oraz DNQX ($20 \mu\text{M}$) celem blokady receptorów glutaminianowych typu AMPA. Związki te pozostawały w komorze pomiarowej do końca trwania eksperymentu. Plastyczność w naszych eksperymentach indukowana była poprzez traktowanie skrawków mózgowych $20 \mu\text{M}$ NMDA przez 3 minuty. Dzięki cyrkulacji natlenowanego aCSF w trakcie eksperymentów, wypłukiwano NMDA z komory pomiarowej. Po upływie 20 minut od wypłukania NMDA, gaboxadol ($1 \mu\text{M}$, inna nazwa - THIP) lub etomidat ($5 \mu\text{M}$) zostały użyte do wzmocnienia prądu tonicznego w komórkach piramidowych oraz interneuronach PV+ i SST+. Prądy toniczne w hipokampie mediowane są głównie przez receptory GABA_A zawierające podjednostki $\alpha 5$ lub δ , stąd wybór wspomnianych substancji do wzmocnienia przewodzenia tonicznego. Gaboxadol wzmacnia prądy synaptyczne zależne od δ -GABA_A, natomiast etomidat wzmacnia aktywność receptorów GABA_A z podjednostkami $\beta 2$ i $\beta 3$. Obie te substancje są od lat skutecznie stosowane w badaniach nad prądami tonicznymi. Ich stosowanie jest najczęściej niezbędne ze względu na niską bazową fizjologiczną wielkość prądów tonicznych w regionie CA1 hipokampa. W końcowej części eksperymentów podawano PTX ($100 \mu\text{M}$ w celu wyciszenia transmisji GABAergiczej. Czynność ta była wymagana do późniejszej analizy prądów tonicznych, która to analiza została opisana w jednym z kolejnych podrozdziałów. W trakcie trwania pomiarów monitorowano opór wejścia, a komórki, u których ten opór zmienił się o więcej niż 20%, były odrzucane z analizy.

Dodatkowo, aby ocenić udział receptorów GABA_A z podjednostką $\alpha 5$ w mediowaniu prądów tonicznych, po dodaniu etomidatu/gaboxadolu podawano L-655,708 (odwrotny agonista $\alpha 5$ GABA_A) przed podaniem PTX, co skutkowało zmniejszeniem wielkości GABAergiczych prądów tonicznych. Aby zapewnić specyficzność działania L-655,708, zastosowano niskie stężenie $20 \mu\text{M}$, ponieważ jego wyższe stężenie mogą wpływać na

aktywność innych typów (zarówno synaptycznych jak i pozasynaptycznych) receptorów GABA_A.

4.1. Technika patch-clamp

Technika patch-clamp umożliwia pomiar prądów lub napięć bezpośrednio z pojedynczych komórek nerwowych. Dzięki zastosowaniu cienkich pipet szklanych (borokrzemianowych) wypełnionych roztworem elektrodowym. Wytworzenie wysokooporowego połączenie pipety pomiarowej na powierzchni błony komórkowej umożliwia rejestrację prądów mediowanych przez pojedyncze kanały jonowe znajdujące się w tzw. Łatce błonowej pod pipetą (konfiguracja *cell-attached*). Zerwanie fragmentu błony komórkowej pod szklaną pipetą poprzez puls ciśnienia, pozwala na kontakt elektryczny z wnętrzem komórki nerwowej, a w konsekwencji rejestrację przez eksperymentatora sygnałów elektrycznych przepływających przez błonę komórkową całej komórki (konfiguracja *whole-cell*). Istnieją jeszcze inne konfiguracje pomiarowe metody patch-clamp, jednak ze względu na fakt, że do przeprowadzenia eksperymentów ukazanych w niniejszej rozprawie doktorskiej zastosowano konfigurację *whole-cell*, inne metody nie zostały opisane. Technika patch-clamp pozwala na pomiary elektrofizjologiczne w dwóch trybach: *current-clamp* oraz *voltage-clamp*. W trybie *current-clamp* eksperymentator może kontrolować prąd płynący przez obwód i obserwację napięcia rejestrowanego przez elektrodę odniesienia. W ramach badań przedstawianych w niniejszej rozprawie, tryb ten był wykorzystywany do rejestracji tzw. *firing pattern*, czyli wzorów wyładowań komórek nerwowych. Drugim trybem metody patch-clamp jest *voltage-clamp*, który umożliwia ustalenie stałego napięcia błony komórkowej i obserwację prądów.

4.2. Krótkotrwałe podanie NMDA jako metoda indukcji plastyczności transmisji GABAergiczej

W badaniach przedstawionych w niniejszej pracy doktorskiej, wykorzystano model plastyczności synaps GABAergiczych, który jest indukowany poprzez krótkotrwałe (3min) podanie agonisty receptora glutaminianu – NMDA (Marsden et al., 2007; Petrini et

al., 2014; Chiu et al., 2018; Wiera et al., 2020). Receptor ten jest szczególnie ważnym dla procesów plastycznych w mózgu, a endogennie stymulowany jest przez glutaminian, główny pobudzający neuroprzekaznik ośrodkowego układu nerwowego. Opisywany tu model plastyczności synaptycznej, jest przykładem modelu tzw. plastyczności heterosynaptycznej, w której wapniowy sygnał inicjujący rozpoczyna się od aktywności receptorów glutaminianu typu NMDA w synapsie pobudzającej, lecz finalnie obserwuje się zmiany w synapsach hamujących. Umiarkowana aktywacja receptorów NMDA wiąże się ze względnie niewielkim wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} , które powoduje rekrutację CaMKII do synaps hamujących. Efektem tego procesu jest fosforylacja gefiryny, w której klastrach kotwiczą receptory $GABA_A$. Dzięki zależnej od białka GABARAP egzocytozie oraz inkorporacji receptorów $GABA_A$, obserwujemy zwiększenie potencjału hamującego synapsy, który utrzymuje się w czasie. Ostatnie badania wskazują również na fakt, że receptory $GABA_A$ znajdujące się poza synapsą, migrują do synaps hamujących po indukcji iLTP. Jednocześnie, manipulując farmakologicznie stężeniem wspomnianych wyżej jonów Ca^{2+} , można uzyskiwać eksperymentalnie zgoła odmienne kierunki plastyczności. Dłuższe niż poprzednio podanie NMDA powoduje zdecydowanie większy napływ jonów wapniowych do wnętrza komórki postsynaptycznej. W tym przypadku dochodzi do aktywacji kalcyneuryny i rekrutacji jej do synaps hamujących. Kalcyneuryna pośredniczy w defosforylacji seryny 327 na podjednostce $\gamma 2$ synaptycznych receptorów $GABA_A$, co z kolei zwiększa boczną ruchliwość tych receptorów, promując ich większe rozproszenie. Ponadto, zależna od wapnia aktywacja białka kalpajny, powoduje redukcję klastrów gefirynowych. W związku z tym obserwuje się zmniejszoną liczbę receptorów $GABA_A$ w synapsie, a w konsekwencji obniżenie siły hamującej synaps $GABA_A$ ergicznych. Zatem, zależny od receptorów NMDA, model plastyczności jest skutecznie wykorzystywanym od niedawna sposobem badania zależności sieciowych w mózgu (Marsden et al., 2007; Saliba et al., 2012; Petrini et al., 2014).

Równolegle do $GABA_A$ ergicznej transmisji synaptycznej, ekstrasynaptyczne receptory $GABA_A$ biorą udział w tzw. hamowaniu tonicznym. Istnieje jednak niewiele naukowych poszlak, które skupiałyby się na zbadaniu rezultatów indukcji plastyczności zależnej od receptorów NMDA. Badania z ubiegłych lat wskazują na zależną od radyksyny

migrację receptorów GABA_A z podjednostką $\alpha 5$ spoza synaps do przestrzeni synaptycznych i ich kontrybucji w przewodzeniu fazowym. Dopiero w ramach badań składających się na niniejszą pracę doktorską dokładniej poruszany jest wątek wpływu indukcji plastyczności GABAergicznej na prądy toniczne w różnych typach komórek – w komórkach piramidowych oraz trzech typach interneuronów (Schulz et al., 2018; Brzdąk et al., 2023).

4.3. Analiza danych elektrofizjologicznych

4.3.1. Analiza wzorca wyładowań komórek nerwowych

Dzięki zastosowaniu bodźców prądowych, w komórkach pobudliwych, jakimi są komórki nerwowe, można wpływać na wartość potencjału błonowego, a jeżeli ten przekroczy wartość progową, doprowadzić do generacji potencjałów czynnościowych. Serie następujących po sobie potencjałów czynnościowych, które generowane są przez zadany w trybie current-clamp bodziec prądowy, nazywamy wzorcami wyładowań komórek. Analiza parametrów wzorców wyładowań pozwoliła nam na rozróżnienie i klasyfikację badanych typów komórek nerwowych. Poprzez pipetę rejestrującą podawano serię bodźców hiper- oraz depolaryzujących (od -200 do + 300 pA, co 20 pA, każdy przez 0.3 sekundy). Poniżej wymienione i opisane zostały parametry uzyskane z analizy wzorców wyładowań:

Potencjał spoczynkowy (V_m) – oznaczano jako potencjał błony przed zadaniem bodźca prądowego

Stała czasowa błony (τ) – wyznaczana za pomocą dopasowania funkcji jednoeksponecjentalnej do fazy narastania odpowiedzi prądowej w efekcie podania -25 pA hiperpolaryzującego bodźca prądowego

Próg generacji potencjału czynnościowego (AP_t) – wyznaczony w czasie trwania bodźca prądowego jako wartość potencjału błony komórkowej, przy którym $dV/dt = 20$ mV/ms

Amplituda potencjału czynnościowego (AP_{amp}) – wyznaczano jako różnicę pomiędzy potencjałem progowym potencjału czynnościowego, a jego najwyższym punktem

Częstotliwość generowania potencjałów czynnościowych – wyznaczano jako liczbę potencjałów czynnościowych wywołanych przez bodziec prądowy o czasie trwania 300ms (podano w Hz)

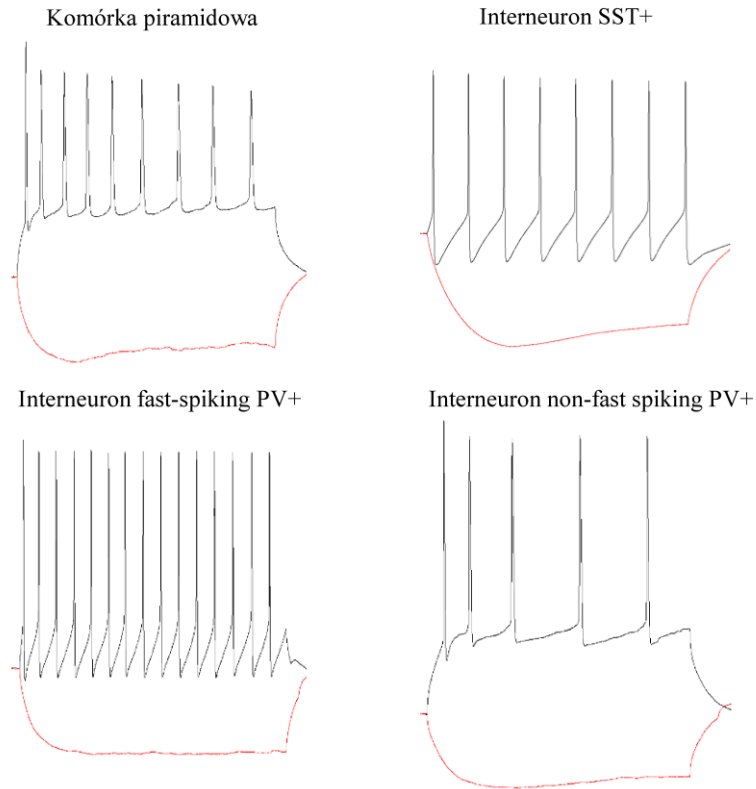
Szerokość połówkowa potencjału czynnościowego ($AP_{1/2}$) – wyznaczano jako szerokość pierwszego wygenerowanego przez komórkę potencjału czynnościowego w połowie amplitudy analizowanego potencjału czynnościowego

Amplituda hiperpolaryzacji następczej (AHP_{amp}) – wyznaczano jako różnicę potencjału pomiędzy AP_t a najmniej dodatnim potencjałem błonowym po pierwszym wygenerowanym potencjałem czynnościowym

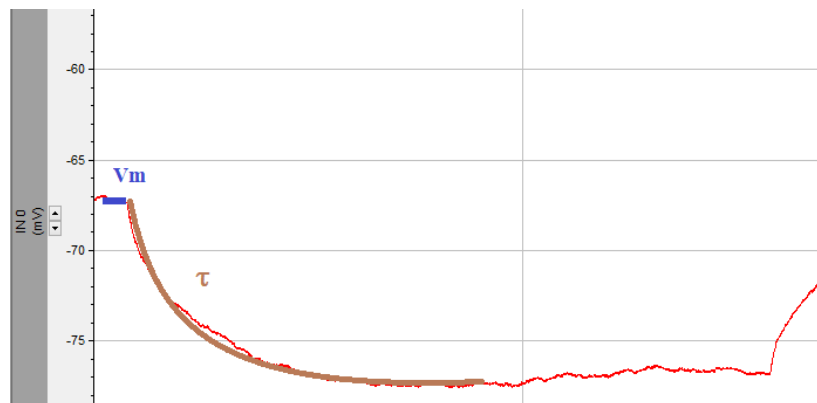
Sag – obliczony za pomocą wzoru $[(1 - \Delta V_{ss}/\Delta V_{max}) \times 100\%]$ z odpowiedzi na bodziec -200 pA, gdzie ΔV_{ss} to różnica potencjałów pomiędzy potencjałem spoczynkowym, a potencjałem błony, gdzie obserwujemy wypłaszczenie fazy narastania odpowiedzi prądowej, a ΔV_{max} to różnica potencjałów pomiędzy potencjałem spoczynkowym, a najmniej dodatnim potencjałem błonowym obserwowanym w trakcie fazy narastania odpowiedzi prądowej

Pojemność błony – wyznaczano jako stosunek stałej czasowej błony i oporu wejściowego badanej komórki.

Wzorce wyładowań

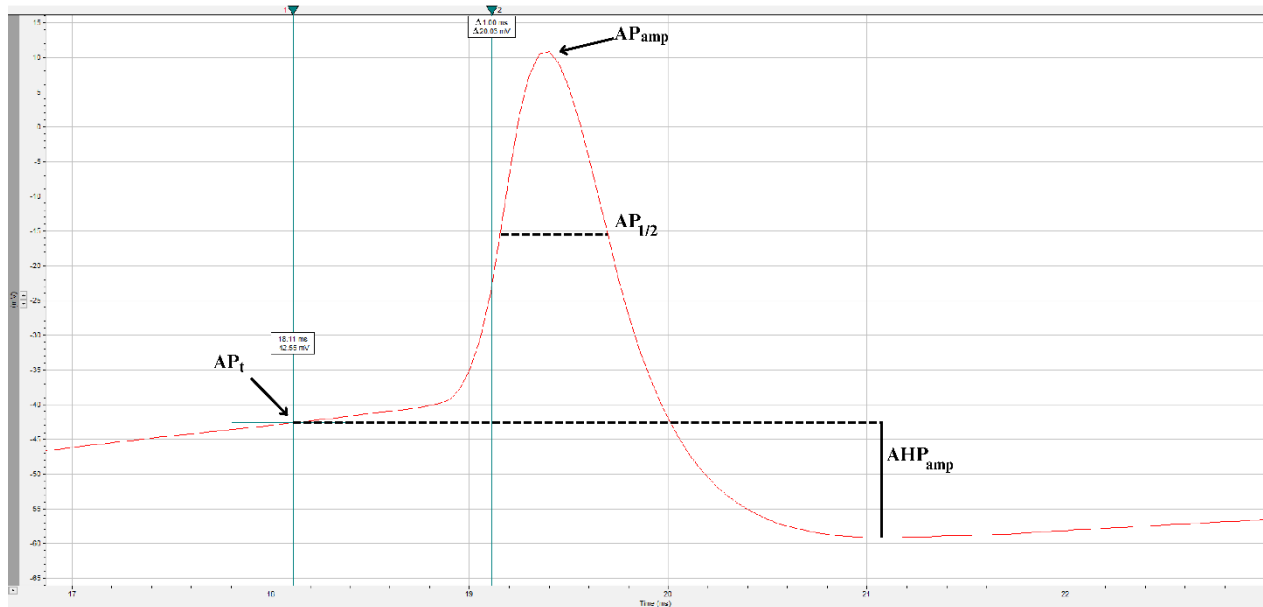


Ryc. 1 Wzory wyładowań badanych typów komórek nerwowych w odpowiedzi na bodziec prądowy. Na czerwono zaznaczono pierwszą odpowiedź komórki na głęboko hiperpolaryzujący bodziec -200 pA.



Ryc. 2 Przebieg odpowiedzi błony komórkowej na hiperpolaryzujący -25 pA impuls prądowy w czasie 300 ms. Na rysunku kolorem czerwonym oznaczono przebieg odpowiedzi neuronu na

impuls prądowy, kolorem niebieskim zaznaczono potencjał błonowy (V_m), zaś brązowym eksponencjalne dopasowanie pozwalające obliczyć stałą czasową τ .

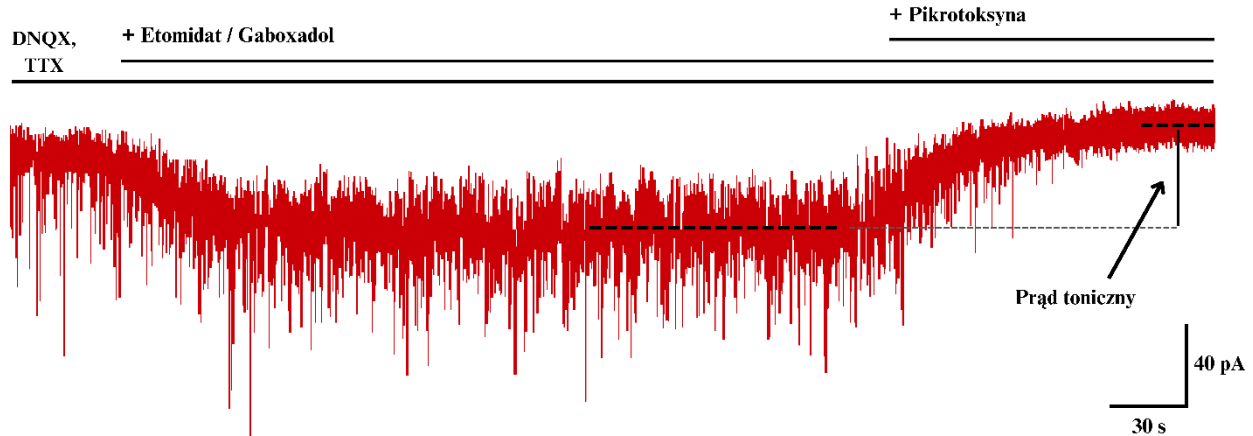


Ryc. 3 Rycina przedstawiająca metody analizy parametrów potencjału czynnościowego komórki nerwowej. Jako AP_t przedstawiono wartość progu generacji potencjału czynnościowego, wyznaczonego jako wartość potencjału błony przy którym $dV/dt = 20 \text{ mV/ms}$. Amplitudę (AP_{amp}) wyznaczono jako różnicę potencjału między AP_t a najwyższym punktem danego potencjału czynnościowego. Szerokość połówkową potencjału czynnościowego $AP_{1/2}$ ustalono jako szerokość (w milisekundach) w połowie AP_{amp} . Amplitudę hiperpolaryzacji następczej (AHP_{amp}) wyznaczono jako różnicę potencjału pomiędzy AP_t a najmniej dodatnim potencjałem błonowym po pierwszym wygenerowanym potencjałem czynnościowym.

4.3.2. Analiza ekstrasynaptycznych prądów tonicznych

Po rejestracji wzorca wyładowań komórki, przeprowadzono pomiary GABAergicznego prądu tonicznego w trybie voltage-clamp, przy ustalonym napięciu -70 mV . Eksperyment rozpoczynano od podania tetrodotoksyny (TTX, bloker zależnych od

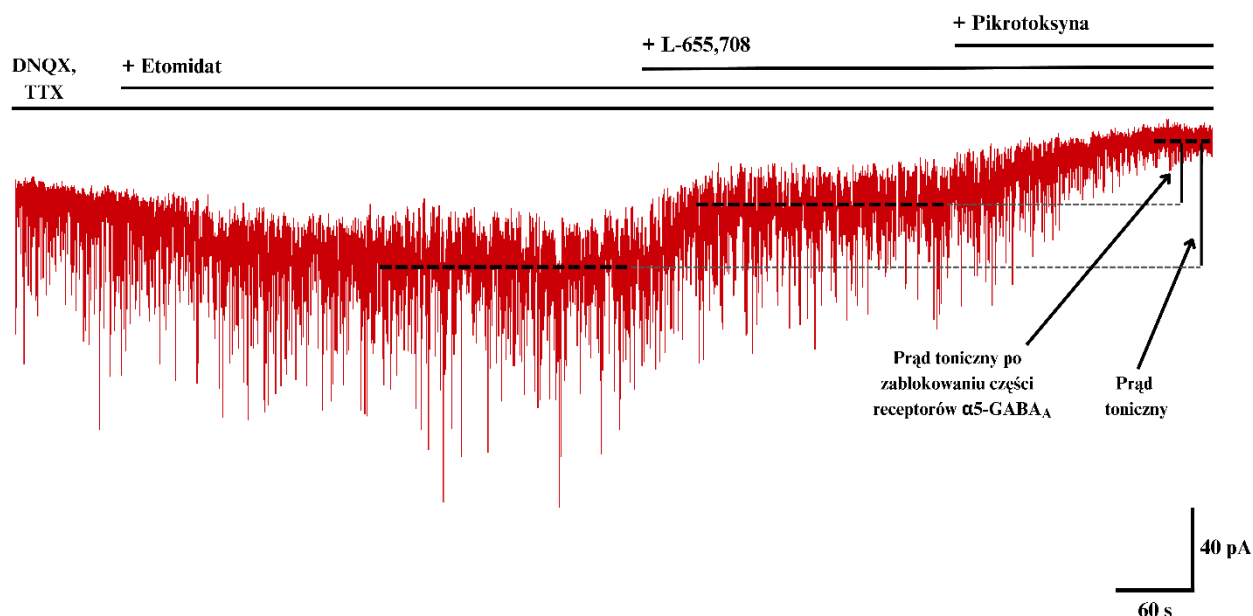
napięcia kanałów sodowych, 1 μM) oraz DNQX (6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione, 20 μM , antagonist receptorów AMPA i receptorów kainianowych). Po podaniu wspomnianych substancji oczekiwano około 8 minut do momentu, w którym nie obserwowano obecności potencjałów czynnościowych. Następnym krokiem była indukcja plastyczności transmisji GABAergicznej w grupach eksperymentalnych. Indukcji tej dokonywano poprzez krótkotrwałe (3min) podanie agonisty receptora glutaminianu (NMDA, 20 μM) do komory zanurzeniowej, w której umieszczony był skrawek mózgowy. W tych grupach oczekiwano 22 minuty przed kolejnymi krokami ze względu na czas potrzebny na wystąpienie zmian plastycznych. W celu wzmocnienia prądów tonicznych gaboxadol (1 μM) lub etomidat (5 μM) były podawane do roztworu aCSF, w którym umieszczony był skrawek. Po kilku minutach od zaprzestania wzrostu prądów tonicznych podawano pikrotoksynę (100 μM) aby zablokować wszystkie receptory GABA_A. Podanie pikrotoksyny pozwala obliczyć amplitudę rejestrowanego przed i po podaniu gaboxadolu/etomidatu. Dodatkowo, uwzględniono zróżnicowanie pomiędzy pojemnością komórek w poszczególnych grupach komórek nerwowych. Zróżnicowanie to może mieć wpływ na liczbę receptorów zaangażowanych w mediowanie prądów tonicznych, a co za tym idzie wpływ na rejestrowany przez eksperymentatora prąd toniczny. Aby zminimalizować wynikającą z tego faktu zmienność, rejestrowany prąd toniczny został znormalizowany do pojemności błony komórkowej, który był każdorazowy obliczany dla każdej z komórek na podstawie stałej czasowej błony oraz oporu wejścia.



Ryc. 4 Rycina przedstawiająca przykładowy pomiar prądu tonicznego. Podczas pomiarów stosowano TTX oraz DNQX. Linie nad przebiegiem wskazują na zastosowanie konkretnych związków farmakologicznych. Podanie etomidatu lub gaxadolu powoduje zwiększenie aktywności ekstrasynaptycznych receptorów $GABA_A$ mediujących GABAergiczny prąd toniczny. Podanie pikrotoksyny powoduje zablokowanie aktywności receptorów $GABA_A$. Taki układ eksperymentalny pozwala wyznaczyć amplitudę prądu tonicznego jako stosunku zmiany linii bazowej przed i po podaniu pikrotoksyny.

Dodatkowo, aby ocenić udział receptorów $GABA_A$ zawierających podjednostkę $\alpha 5$ w całkowitym GABAergicznym prądzie tonicznym, po podaniu etomidatu dodatkowo stosowaliśmy L-655,708 przed podaniem pikrotoksyny. Proporcja prądu mediowanego przez receptory $\alpha 5GABA_A$ została obliczona dla każdej komórki zgodnie ze wzorem $\Delta I \text{ L-655,708} / (\Delta I \text{ L-655,708} + \Delta I \text{ PTX})$ gdzie $\Delta I \text{ L-655,708}$ and $\Delta I \text{ PTX}$ zostały oznaczone jako zmiany linii bazowej (rozumiane jako zmniejszenie prądów tonicznych) po potraktowaniu skrawków mózgowych tymi związkami. Aby zapewnić specyficzność działania na $\alpha 5GABA_A$, zastosowano niskie, 20 nM stężenie L-655,708, ponieważ jego wyższe stężenia

mogą wpływać na aktywność innych synaptycznych oraz pozasynaptycznych receptorów GABA_A.



Ryc. 5 Rycina przedstawiająca pomiar prądu tonicznego wzmocnionego podaniem etomidatu z zastosowaniem L-655,708. Podczas pomiarów stosowano TTX oraz DNQX. Linie nad przebiegiem wskazują na zastosowanie konkretnych związków farmakologicznych. Podanie etomidatu powoduje zwiększenie aktywności ekstrasyneptycznych receptorów GABA_A z podjednostkami β2 i β3. Po ustabilizowaniu się linii bazowej, podawano L-655,708, który w stężeniu 20 nM blokuje specyficzną część receptorów GABA_A z podjednostką α5. Następnie, podawano picrotoksynę aby zablokować całkowicie aktywność receptorów GABA_A. Taki układ eksperymentalny pozwala wyłuskać potencjalne zmiany w udziale poszczególnych typów receptora GABA_A w mediowanym przez nie prądzie tonicznym.

5. Analiza statystyczna

Badania zaprezentowane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej były zaplanowane w taki sposób, aby wygenerować grupy eksperymentalne równej wielkości. W każdej badanej grupie znajdowały się pomiary ze skrawków mózgowych zarówno

samic, jak i samców. Wielkość grupy (n) dla każdej z grup została zaplanowana w taki sposób, aby spełnione zostało kryterium mocy analizy statystycznej ($\beta > 0,8$). Do analizy danych wykorzystano program SigmaPlot (Systat Software). Dane na wykresach przedstawiono jako średnią \pm SEM. Zestawy danych przeszły analizę normalności rozkładów (test Kolmogorova-Smirnova) oraz równości wariancji (test mediany Levene'a). Porównania między grupami przeprowadzono za pomocą niesparowanego oraz sparowanego test *t*-Studenta. Różnice uznano za istotne statystycznie, gdy uzyskano wartość $p < 0.05$.

WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ

Cykl publikacji

1. Wyroslak M., Lebida L.,Mozrzyimas JW. (2021) Induction of Inhibitory Synaptic Plasticity Enhances Tonic Current by Increasing the Content of $\alpha 5$ -Subunit Containing GABAA Receptors in Hippocampal Pyramidal Neurons. *Neuroscience* 15;467:39-46. doi: 10.1016/j.neuroscience.2021.05.020

Punkty MEiN: 140pkt.

IF: 3.708

2. Wyroslak M., Dobrzanski G., Mozrzyimas JW. (2023) Bidirectional plasticity of GABAergic tonic inhibition in hippocampal somatostatin- and parvalbumin-containing interneurons. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 17:1193383 doi: 10.3389/fncel.2023.1193383

Punkty MEiN: 100pkt.

IF: 6.147

PUBLIKACJE

1.

“Induction of Inhibitory Synaptic Plasticity Enhances Tonic Current by Increasing the Content of $\alpha 5$ -Subunit Containing GABAA Receptors in Hippocampal Pyramidal Neurons”

Marcin Wyroślak, Katarzyna Lebida, Jerzy W. Mozrzymas

Neuroscience 15 (2021), 39-46.

doi: 10.1016/j.neuroscience.2021.05.020

Induction of Inhibitory Synaptic Plasticity Enhances Tonic Current by Increasing the Content of $\alpha 5$ -Subunit Containing GABA_A Receptors in Hippocampal Pyramidal Neurons

Marcin Wyroślak, * Katarzyna Lebida and Jerzy W. Mozrzymas

Department of Biophysics and Neuroscience, Wrocław Medical University, 50-367 Wrocław, Poland

Abstract—It is known that besides synaptic inhibition, there is a persistent component of inhibitory drive mediated by tonic currents which is believed to mediate majority of the total inhibitory charge in hippocampal neurons. Tonic currents, depending on cell types, can be mediated by a variety of GABA_A receptor (GABA_AR) subtypes but in pyramidal neurons, $\alpha 5$ -subunit containing receptors were found to be predominant. Importantly, $\alpha 5$ -GABA_ARs were implicated in both inhibitory and excitatory synaptic plasticity as well as in a variety of cognitive tasks. In the present study, we asked whether the protocol that evokes NMDAR-dependent GABAergic inhibitory long-term potentiation (iLTP) also induces the plasticity of tonic inhibition in hippocampal pyramidal neurons. Our whole-cell patch-clamp recordings revealed that the induction of this type of iLTP is associated with a marked increase in tonic current. By using the specific inverse agonist of $\alpha 5$ -containing GABA_ARs (L-655,709) we provide evidence that this plastic change in tonic current is correlated with an increased proportion of this type of GABA_ARs. On the contrary, the iLTP induction did not affect the tonic current potentiated by THIP, indicating that the pool of δ subunit-containing GABA_ARs receptors remains unaffected. We conclude that the $\alpha 5$ -GABA_ARs-dependent plasticity of tonic inhibition is a novel dimension of the neuroplasticity of the inhibitory drive in the hippocampal principal neurons. Overall, $\alpha 5$ -containing GABA_ARs emerge as key players in a variety of plasticity mechanisms operating over a large span of time and spatial scales. © 2021 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: GABA, iLTP, extrasynaptic receptors, tonic inhibition, hippocampus.

INTRODUCTION

It has been recognized that besides transient and well localized synaptic inhibition, there is a persistent component of inhibitory drive, called tonic inhibition (TI), mediated by GABA_A receptors located outside the synapses (Farrant and Nusser, 2005; Glykys and Mody, 2007a, 2007b). Ambient GABA is present in extracellular fluids at low concentrations (Lerma et al., 1986) and activates high-affinity extrasynaptic GABA_ARs which, depending on cell type, could include various proportions of $\alpha 5$ - and δ -subunit containing receptors (Scimemi et al., 2006; Prenosil et al., 2006; for review see Brickley and Mody, 2012) reducing the input resistance and thereby

the neuronal excitability. Indeed, tonic GABAergic inhibition shows cell-type specificity, depending on subunit stoichiometry of expressed GABA_ARs which determines agonist affinity, kinetics and susceptibility to pharmacological modulation. Extrasynaptic GABA_ARs in different neuronal types may contain various combinations of $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ and δ subunits (Wisden et al., 2002; Chandra et al., 2006; Caraiscos et al., 2004; Serwanski et al., 2006; Farrant and Nusser, 2005). Although $\alpha 5$ -containing receptors represent < 5% of the GABA_ARs population in the mammalian brain, in the pyramidal neurons of hippocampal CA3/CA1 regions, tonic conductance is mediated primarily by this receptor type while δ -containing GABA_ARs contribute to a lesser extent (Caraiscos et al., 2004). In addition, Mortensen and Smart (2006) suggested the involvement of $\alpha \beta$ receptors in tonic inhibition in CA3/CA1 pyramidal cells.

An increasing body of evidence suggests that TI and, in particular, extrasynaptic $\alpha 5$ -containing GABA_ARs may play a role in learning and memory formation depending on the hippocampus (Wang et al., 2012; Lee et al., 2016; Cushman et al., 2014; Whissell et al., 2013; Möhler and Rudolph, 2017). It has been demonstrated

*Corresponding author. Address: Department of Biophysics, Wrocław Medical University, Chalubinskiego 3, 50-367 Wrocław, Poland.
E-mail address: marcin.wyroslak@365.student.umed.wroc.pl (M. Wyroślak).

Abbreviations: $\alpha 5$ -GABA_ARs, $\alpha 5$ -subunit containing γ -Aminobutyric acid type A receptor; aCSF, Artificial cerebrospinal fluid; CA1, Cornu Ammonis 1; Cm, Membrane Capacitance; GABA_AR, γ -Aminobutyric acid type A receptor; iLTP, Inhibitory long-term potentiation; mIPSCs, Miniature inhibitory postsynaptic currents; NMDA, N-Methyl-D-aspartic acid; NMDAR, N-Methyl-D-aspartic acid receptor; PTX, Picrotoxin; TBS, Theta burst stimulation; TI, Tonic inhibition.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2021.05.020>
0306-4522/© 2021 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

that upregulation of $\alpha 5$ -GABA_ARs by general anesthetics impairs memory while their inhibition improves it (Zurek et al., 2012, 2014; Saab et al., 2010; Xu and Wong, 2018). Moreover, $\alpha 5$ -GABA_ARs knockout mice exhibited improved spatial learning and altered GABAergic synaptic transmission (Collinson et al., 2002). Hippocampal $\alpha 5$ -GABA_ARs are also involved in the modulation of extinction and associative learning (Crestani et al., 2002; Yee et al., 2004). In addition, specific $\alpha 5$ -GABA_AR inhibitors were also found to be anxiogenic (Navarro et al., 2002; Behlke et al., 2016). However, $\alpha 5$ -containing GABA_ARs are present both extrasynaptically and postsynaptically and their distributions among these localizations may alter upon plastic changes. It is thus difficult to attribute their cognitive impact specifically to the modulation of synaptic transmission or of tonic inhibition.

It is widely accepted that the formation of memory traces, at least at the early stages, involves synaptic plasticity phenomena. For long time, research into the mechanisms of plasticity was focused on excitatory synapses. However, in the past decade or so, it has been recognized that inhibitory synapses undergo activity-dependent long-term plastic changes (Field et al., 2020; Yap et al., 2021; Shi et al., 2020; Wiera et al., 2021). A well-documented example of GABAergic plasticity is NMDAR-dependent inhibitory long-term potentiation, described in the hippocampus (Marsden et al., 2007) and cerebral cortex (Chiu et al., 2018). This form of iLTP is induced heterosynaptically through moderate NMDAR activation (Marsden et al., 2010) and is expressed postsynaptically (Petriani et al., 2014). Much less, however, is known about the plasticity of tonic GABAergic inhibition. The fact that, as mentioned above, TI might be involved in cognitive functions raises the possibility that its participation in memory formation (or impairment) could be related to the plasticity of TI. Our group has found, for instance, that GABAergic tonic currents in the barrel cortex can be altered upon learning (Urban-Ciecko and Mozrzymas, 2011; Lebida and Mozrzymas, 2017). Moreover, recent studies have shown that $\alpha 5$ -GABA_ARs, known to shape tonic inhibition in hippocampal pyramidal neurons, are involved in regulating glutamatergic plasticity by suppressing cumulative LTP induced by TBS (Davenport et al., 2020). Taking into account these premises, we asked whether the protocol that evokes NMDAR-dependent GABAergic iLTP also induces the plasticity of tonic inhibition in hippocampal pyramidal neurons. We report that induction of synaptic iLTP is associated with a marked increase in tonic current. Moreover, this plastic change in TI is correlated with an increased proportion of $\alpha 5$ -GABA_ARs while the pool of δ -subunit-containing receptors is not affected. We conclude that the plasticity of tonic inhibition is a novel dimension of the neuroplasticity of the inhibitory drive in the hippocampal principal neurons.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

Animals were mated in the animal facility of the Wrocław Medical University and pregnant females were isolated

and allowed to deliver normally and housed on a natural light/dark cycle (12 h/12 h) with food and water ad libitum. Experiments were performed on 18–25 day old C57BL/6 wild-type mice of either sex. The total number of animals used in this study was 38. All of the experiments were conducted in accordance with the guidelines of the European Communities Council Directive (86/609/EEC) of 24 November 1986 and approved by the Local Bioethical Committee for Experiments on Laboratory Animals. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Drugs

We used the following drugs: Tetrodotoxin (TTX; sodium channel selective blocker), 6,7-Dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX; selective blocker of non-NMDA glutamate receptors), and Gaboxadol (THIP; superagonist for extrasynaptic δ -subunit-containing GABA_ARs), Etomidate ($\beta 2/3$ subunits-containing GABA_A receptors function enhancer), L-655,708 (selective inverse agonist for $\alpha 5$ -subunit-containing GABA_ARs) and Picrotoxin (PTX; nonspecific GABA_AR antagonist), N-Methyl-D-aspartic acid (NMDA; Selective NMDA agonist). All of the drugs listed above were purchased from Tocris Bioscience (UK).

Brain slices preparation

Mice were anesthetized using isoflurane inhalation and then sacrificed by decapitation. The brains were placed in a cold artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing (in mM) NaCl 119, KCl 2.5, NaH₂PO₄ 1, NaHCO₃ 26.3, MgSO₄ 1.3, CaCl₂ 2.5, and glucose 11, pH 7.4 bubbled with carbogen (95 % O₂ + 5 % CO₂). Hippocampal brain slices (350 μ m thick) were cut with a vibratome (Leica VT1200S, Germany) and transferred to a recovery chamber containing aCSF. The solution (at room temperature) was gassed with carbogen for at least 1 h before electrophysiological experiments.

Electrophysiological recordings and data analysis

Slices were transferred to a recording chamber filled with aCSF continuously bubbled with carbogen, at a relatively high flow rate of 2.0–3.0 ml/min, which was found favorable for long cell viability during recordings. Hippocampal CA1 pyramidal cells were identified visually under a water immersion objective (40 \times) with infrared differential interference contrast. Pyramidal cells were distinguished from interneurons in the stratum pyramidale based on the characteristics of firing patterns (sag occurrence, regular accommodating train of action potentials at frequencies below 30 Hz) and the presence of a prominent, thick proximal apical dendrite. Whole-cell patch-clamp recordings were performed using borosilicate patch pipettes (2.5–4.5 M Ω) filled with an intracellular solution containing (in mM) potassium gluconate 10, KCl 125, EGTA 1 mM, HEPES 10, MgATP 4, sucrose 5, pH 7.25, 295 MOsm (Marsden et al., 2007). Currents were digitized at 20 kHz and filtered

at 6 kHz using aMulti-Clamp 700B amplifier and Axon Digidata 1550 (Molecular Devices).

The value of tonic current density was calculated with reference to the signal recorded during PTX (100 μ M) administration, normalized to whole-cell membrane capacitance (C_m). Membrane cell capacitance was determined as a ratio of the membrane time constant and the input resistance. The membrane time constant was estimated from the exponential fit to the time course of the membrane voltage (current-clamp mode) in response to small (-25 pA) hyperpolarizing current injection (Urban-Ciecko et al., 2010; Lebeda and Mozzyrmas, 2017).

In control experiments, etomidate (5 μ M) or THIP was used (1 μ M) to enhance tonic currents. Besides controls, we have considered a group of cells in which iLTP was induced by treating the slice for 3 min with 20 μ M NMDA (so-called iLTP group). In a series of experiments, we have additionally used L-665708 (20 nM) before the application of PTX in order to evaluate the contribution of $\alpha 5$ -GABA_A receptors (Fig. 2A).

Statistical analysis

Data analyses were performed using SigmaPlot (Systat Software) and a fixed-effect statistical model. The electrophysiological data are expressed as mean \pm SEM. The compared datasets passed tests for normal distributions (Kolmogorov-Smirnov test) and equal variances (Levene Median test). Comparisons were performed using Student's *t*-test (paired or

unpaired). Differences were considered statistically significant when values of $p < 0.05$ were obtained.

RESULTS

iLTP induction enhances tonic inhibition in hippocampal pyramidal cells

We sought to investigate whether the induction of iLTP affects tonic currents in CA1 pyramidal cells. To this end, we have considered two groups of recordings: controls and from neurons in NMDA-treated slices (3 min, iLTP induction). To assure that NMDA treatment indeed induced iLTP, after this induction protocol, a 15 min recording of synaptic currents was performed to collect a sufficient number of mIPSCs for analysis. As expected, treatment with NMDA resulted in enhancement of mIPSC amplitude by an average of 15.812 \pm 4.659%; $p = 0.026$; $n = 5$ (not shown), confirming that in this series of experiments iLTP induction was successful. Since the tonic currents in hippocampal pyramidal neurons are relatively small (Caraiscos et al., 2004; Glykys et al., 2008; Zarnowska et al., 2015), in our experiments they were enhanced by etomidate (5 μ M) both in the control and NMDA-treated groups of cells (Fig. 1A). As expected, etomidate significantly increased tonic current density measured in the control group (Baseline: 0.062 \pm 0.020 pA/pF; Etomidate: 0.212 \pm 0.028 pA/pF; $t_4 = -4.33$; $p \leq 0.05$; Fig. 1A, B) and after iLTP induction (Baseline: 0.107 \pm 0.033 pA/pF; Etomidate: 0.311 \pm 0.281 pA/pF; $t_5 = -5.63$; $p \leq 0.01$; Fig. 1A, B).

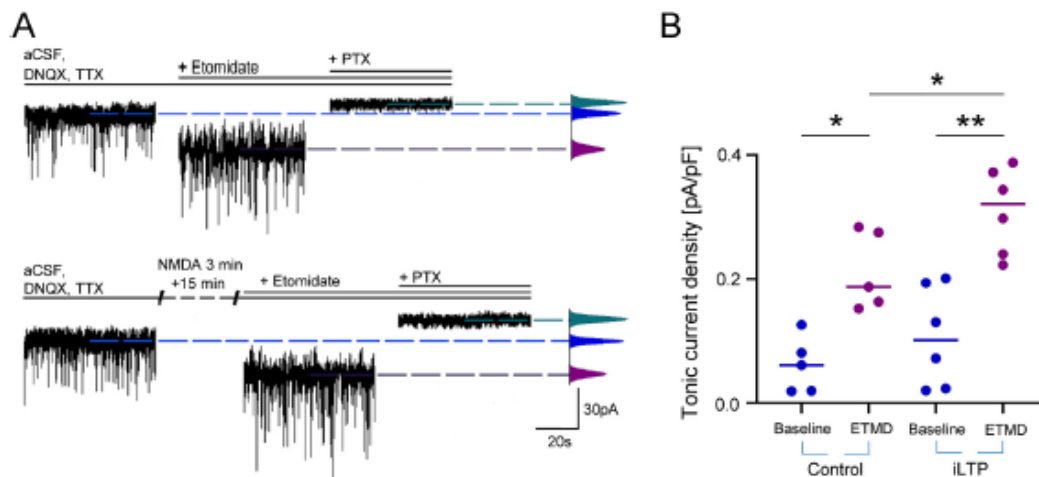


Fig. 1. iLTP induction in CA1 pyramidal cells enhances tonic current. **(A)** Representative current traces in the control (upper) and iLTP (lower) groups. Insets indicate the application of aCSF with DNQX and TTX, etomidate (5 μ M) and picrotoxin (PTX; 100 μ M). iLTP was induced by the application of 20 μ M NMDA for 3 min. The histograms on the right represent current distributions. **(B)** Statistics for tonic current density normalized to membrane capacitance (pA/pF) for baseline and etomidate (ETMD) treatment in the control and iLTP groups. Currents were measured with reference to the signal upon picrotoxin administration. Statistics within the control and iLTP groups (comparison between baseline and ETMD) were analysed using the paired *t*-test whereas currents measured in the presence of ETMD in the control vs iLTP groups were compared with the unpaired *t*-test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Center line represents the median and circles in B represent values collected in recordings from separate cells.

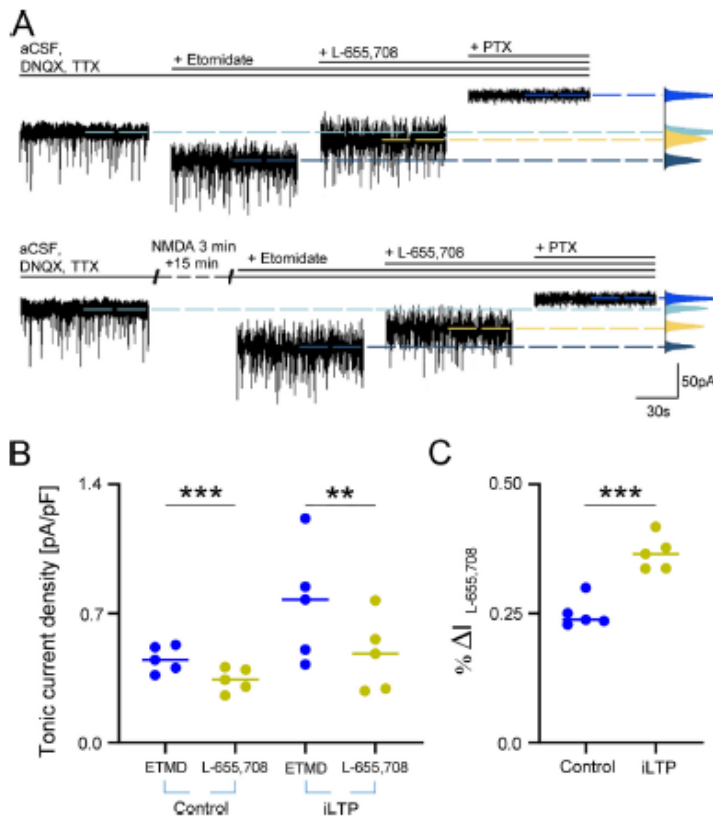


Fig. 2. Induction of iLTP enhances the proportion of L-655,708-sensitive tonic current mediated by $\alpha 5$ -GABA_ARs. **(A)** Representative current traces in the control (upper) and iLTP (lower) groups. Insets indicate the application of aCSF with DNQX and TTX, etomidate (5 μ M), L-655,708 (20 nM) and picrotoxin (PTX; 100 μ M). The histograms on the right represent current distributions. **(B)** Statistics for tonic current density normalized to membrane capacitance (pA/pF) for currents enhanced by etomidate (ETMD) and those treated with L-655,708 in the control and iLTP groups. Currents were measured with reference to the signal upon picrotoxin administration. Comparisons were made with the paired *t*-test. Note markedly larger current reduction by L-655,708 in the iLTP group. **(C)** Statistics of the mean percentage of L-655,708-sensitive component (mediated by $\alpha 5$ -GABA_ARs) in the control and iLTP groups. For this comparison, the unpaired *F*-test was used. ***p* < 0.01, ****p* < 0.001. Center line represents the median and circles in B and C represent values collected in recordings from separate cells.

Interestingly, we found that the average GABAergic tonic current density was significantly larger in the iLTP group (Control: 0.212 ± 0.028 pA/pF; iLTP: 0.311 ± 0.028 pA/pF; $t_5 = -2.46$; $p \leq 0.05$; Fig. 1B). Altogether, this data provided the first evidence that iLTP induction markedly enhances tonic inhibition in CA1 pyramidal cells.

iLTP-related enhancement of tonic current is due to increased content of $\alpha 5$ -GABA_ARs

As mentioned in the Introduction, $\alpha 5$ -GABA_ARs were shown to be major players in mediating tonic currents in

hippocampal pyramidal neurons and they are also involved in a variety of cognitive functions. We therefore asked whether these receptors were involved in the observed enhancement of tonic currents upon induction of iLTP. It needs to be considered that etomidate is not specific for $\alpha 5$ -GABA_ARs as it may enhance the function of δ -GABA_ARs or $\alpha \beta$ -GABA_ARs, which might also contribute to tonic conductance in CA1 pyramidal cells, although to a smaller extent. We thus decided to use a specific inverse agonist for $\alpha 5$ -GABA_ARs, L-655,708 to check to what extent iLTP induction affects the content of $\alpha 5$ -GABA_A receptors. To ensure the specificity of action on $\alpha 5$ -GABA_ARs, 20 nM of L-655,708 was used, which is expected to potently block this receptor being still selective for this subtype. Higher concentrations of this compound might affect other synaptic or extrasynaptic GABA_ARs (Atack et al., 2006; Vargas-Caballero et al., 2010). In the control and iLTP groups, tonic currents were enhanced by etomidate (5 μ M) and then L-655,708 was used, revealing currents mediated by $\alpha 5$ -GABA_ARs. Afterward, 100 μ M PTX was administered completing the block of GABAergic currents (Fig. 2A, see also the Experimental Procedures section).

As shown in Fig. 2B in both the control and iLTP groups, L-655,708 clearly reduced the tonic current (Control: 0.453 ± 0.032 pA/pF, L-655,708 treatment: 0.341 ± 0.028 pA/pF; $t_4 = 27.87$; $p \leq 0.001$; iLTP group: 0.753 ± 0.140 pA/pF, L-655,708 treatment: 0.478 ± 0.091 pA/pF; $t_4 = 5.48$; $p \leq 0.01$). However, the mean percentage of L-655,708-sensitive component (calculated for each cell as $\Delta_{L-655,708}/(\Delta_{L-655,708} + \Delta_{PTX})$, where $\Delta_{L-655,708}$ and Δ_{PTX} are current reductions following the administration of L-655,708 and PTX, respectively) was significantly larger in the iLTP group (Control: 0.251 ± 0.013 ; iLTP group: 0.367 ± 0.015 ; $t_5 = -5.90$; $p \leq 0.001$; Fig. 2C). Thus, in summary, this set of data provides evidence that the observed increase in the tonic current following the application of iLTP induction is correlated with an increased content of $\alpha 5$ -GABA_ARs with respect to the control group.

iLTP induction does not affect δ -GABA_ARs of tonic currents

As already mentioned, the tonic current measured here from pyramidal neurons was enhanced by etomidate which shows poor selectivity for GABA_AR subtypes and, even if δ -GABA_ARs are expected not to be predominant, we have checked the contribution of these receptors to measured tonic current in the control and iLTP groups. For this purpose we have used THIP (1 μ M), a superagonist of δ -GABA_ARs (Fig. 3A). As shown in Fig. 3B, the application of THIP significantly increased the density of tonic current in the control group (Baseline: 0.087 ± 0.025 pA/pF; t_{HIP} : 0.169 ± 0.023 pA/pF; $t_4 = -3.39$; $p \leq 0.05$; Fig. 1B) and after iLTP induction (Baseline: 0.076 ± 0.011 pA/pF; t_{HIP} : 0.166 ± 0.017 pA/pF; $t_4 = -5.25$; $p \leq 0.01$; Fig. 3B).

Notably, the density of currents with the component mediated by δ -GABA_ARs enhanced by THIP were not affected by the induction of long-term potentiation at inhibitory synapses (Control group: 0.182 ± 0.019 pA/pF; iLTP group: 0.149 ± 0.024 pA/pF; $t_8 = 0.10$; $p \geq 0.05$; Fig. 3B). These results thus indicate that the content of δ -GABA_ARs is unaffected by iLTP induction, contrary to the component of tonic current mediated by $\alpha 5$ -GABA_ARs.

DISCUSSION

The most important finding of the present study is that the induction of heterosynaptic iLTP by transient administration of NMDA causes, besides the

enhancement of mIPSC, a marked increase in the tonic current in CA1 pyramidal neurons. Furthermore, we demonstrate that this upregulation of tonic conductance is associated with increased content of $\alpha 5$ -containing GABA_ARs whereas the proportion of receptors with δ subunit is unaffected. This is, to our knowledge, the first demonstration that the protocol widely used in the induction of inhibitory synaptic plasticity is also enhancing, in parallel, the tonic GABAergic drive in the same pyramidal neuron. Importantly, tonic inhibition mediates as much as approximately 75% of the total inhibitory charge in hippocampal neurons (Mody and Pearce, 2004). Thus, the novel plasticity of the tonic drive described in this study is likely to have a marked regulatory impact on GABAergic inhibition of principal neurons.

Because of the relatively intense superfusion of slices with aCSF in our recordings (Experimental Procedures), which is expected to markedly washout ambient GABA (Glykys and Mody, 2007a, 2007b; 2013), we have enhanced tonic currents with etomidate or THIP as also practiced by other investigators (e.g. Cheng et al., 2006; Martin et al., 2009; Zarnowska et al., 2015; Rodgers et al., 2015). This procedure enabled us to reliably discern subtle changes in tonic current densities between control and iLTP groups (Figs. 1–3).

It is generally accepted that in hippocampal pyramidal neurons, most of tonic current is mediated by $\alpha 5$ -containing GABA_ARs (e.g. Glykys et al., 2008) but in our experiments, the current sensitive to L-655,708 contributed to it to a smaller proportion (Fig. 2C). We see two possible reasons for this underestimation of the tonic current component mediated by these receptors in our

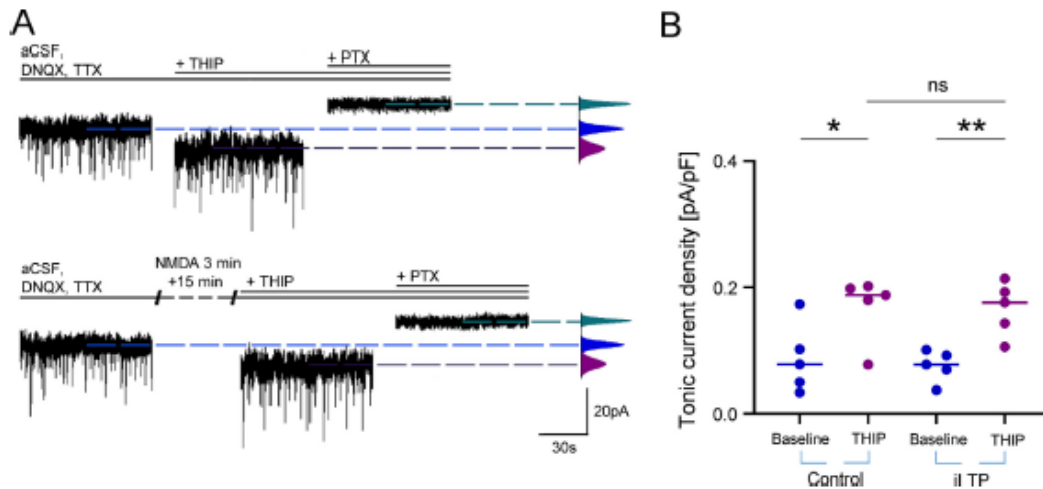


Fig. 3. iLTP induction does not affect tonic currents mediated by δ -GABA_ARs. (A) Representative current traces in the control (upper) and iLTP (lower) groups. Insets indicate the application of aCSF with DNQX and TTX, THIP (1 μ M) and picrotoxin (PTX; 100 μ M). The histograms in the right represent current distributions. (B) Statistics for tonic current density normalized to membrane capacitance (pA/pF) for baseline and THIP treatment in the control and iLTP groups. Currents were measured with reference to the signal upon picrotoxin administration. Statistics within the control and iLTP groups (comparison between baseline and THIP) were analysed using the paired *t*-test whereas currents measured in the presence of THIP in the control vs iLTP groups were compared with the unpaired *t*-test. Note that iLTP does not affect the current measured in the presence of THIP. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ns nonsignificant. Center line represents the median and circles in B represent values collected in recordings from separate cells.

experiments. First, we have used a concentration of L-655,708 (20 nM) which is not fully saturating because at higher doses (e.g. >50–100 nM) the selectivity of this compound for this receptor type becomes questionable (Quirk et al., 1996; Atack et al., 2006; Vargas-Caballero et al., 2010). Second, it cannot be excluded that the effective concentration of this compound within a slice, around neurons from which recordings were made, was smaller than 20 nM due to limited perfusion through the slice tissue. In the case of the latter scenario, however, the actual proportion of conductance mediated by $\alpha 5$ -containing GABA_ARs would be larger and, most importantly, the increase in the proportion of these receptors after iLTP induction would be higher than that estimated in experiments presented in Fig. 2.

It is particularly interesting that the plastic component of the tonic current observed in our experiments is selectively mediated by $\alpha 5$ -containing GABA_ARs. Indeed, currents related to GABA_ARs comprising the δ subunit were clearly present but remained insensitive to the iLTP induction (Fig. 3). As already mentioned, the involvement of GABA_ARs with $\alpha 5$ subunits was implicated in a number of plasticity phenomena and behavioral tasks. These receptors are known to concentrate extrasynaptically by means of radixin-mediated anchorage at the cytoskeleton (Loeblich et al., 2006). It has been demonstrated that lateral mobility of $\alpha 5$ -GABA_ARs depends on the phosphorylation state of radixin, thereby regulating the transfer of these receptors into synapses where they bind to gephyrin molecules, and get involved in phasic inhibition (Vargas-Caballero et al., 2010; Zarnowska et al., 2009; Schulz et al., 2018). A recent study by Schulz et al. (2018) suggests a relevant functional connection between $\alpha 5$ -GABA_ARs and NMDARs on the dendrites of hippocampal pyramidal cells. These results indicate that $\alpha 5$ -GABA_ARs mediate the control of NMDARs activation, nonlinear dendritic integration and firing, thereby additionally emphasizing the role of $\alpha 5$ -GABA_ARs in NMDAR-dependent synaptic plasticity (Schulz et al., 2018). In an elegant study, Hausrat et al. (2015) have demonstrated that this extrasynaptic pool of $\alpha 5$ -containing GABA_ARs is indeed regulated by radixin phosphorylation and that their transfer to synaptic densities underlies potent plastic changes at inhibitory synapses. Moreover, they have shown that radixin knockout affected short-term memory and reversal learning while phosphorylation of this protein in wild-type mice caused experience-dependent changes when the animal was exposed to novel environments. However, in experiments by Hausrat et al. (2015), manipulations of radixin phosphorylation did not affect tonic current. A likely explanation for this observation is that tonic current, measured in the whole-cell mode, in the absence or presence of exogenously applied 100 nM GABA, remained insensitive to the transfer of $\alpha 5$ -containing GABA_ARs from the extrasynaptic reservoir to the synapses, as the overall content of these receptors within the membrane might remain unaffected. It cannot be also excluded, however, that GABA concentration of 100 nM was too small to generate a sufficiently large signal to discern subtle differences in tonic currents (see above the problem of

possible washout of ambient GABA, Glykys and Mody, 2007a, 2007b; Bright and Smart, 2013). The clear upregulation of tonic current due to increased content of $\alpha 5$ -containing GABA_ARs revealed in our experiments demonstrates that, in contrast to observations by Hausrat et al. (2015), our iLTP induction protocol results in an enrichment of plasma membrane receptor population most likely due to exo- and endocytic exchange of vesicular receptors. Interestingly, the plasticity mechanism related to the translocation of $\alpha 5$ -containing GABA_ARs from extrasynaptic areas to synaptic densities is not limited to inhibitory synapses. In a recent study, Davenport et al. (2020) reported that the induction of excitatory LTP relocates GABA_ARs with $\alpha 5$ subunit to the glutamatergic synapse thus interrupting the positive feedback in strengthening this synapse, enabling to preserve memory storage. Consistent with previous studies, Davenport et al. (2020) also reported that the blockade of $\alpha 5$ -containing GABA_ARs with highly specific and efficient photosensitive tools enhanced reversal learning. Thus, available evidence clearly indicates that the transfer of GABA_ARs with $\alpha 5$ subunit from extrasynaptic zones to the synapses is a major player in regulating the synaptic plasticity of both inhibitory and excitatory transmission. Our results extend this view by revealing that these receptors additionally constitute a plastic component of the tonic current in pyramidal neurons which can be activated by stimuli known to affect inhibitory synaptic plasticity. Thus, a picture emerges that GABA_ARs with $\alpha 5$ subunit may operate as a “universal” player, able to shape three distinct aspects of neuronal plasticity: plastic changes at inhibitory and excitatory synapses and regulation of tonic conductance which are commonly perceived as separate phenomena.

While the present study provides evidence for a novel form of inhibitory tonic current plasticity, the major unresolved question is the involvement of this specific paradigm of plastic changes in cognitive processes. Interestingly, Wang et al. (2012) observed increased tonic currents mediated by $\alpha 5$ -containing GABA_ARs upon inflammation and correlated this observation with memory deficits. However, the question whether or not this pathological state affected memory and learning dependent on synaptic plasticity related to this receptor was not systematically addressed. Generally, although there is a growing consensus that manipulations (genetic or pharmacological) of $\alpha 5$ -containing GABA_ARs, especially in the hippocampus, affect memory and learning (e.g. Collinson et al., 2002; Saab et al., 2010; Zurek et al., 2012, 2014; Möhler and Rudolph, 2017) it is difficult to dissect the specific impacts of synaptic and tonic components of plasticity on observed cognitive phenotypes. It is noteworthy that in the aforementioned study by Hausrat et al. (2015), the observed cognitive impact of radixin-dependent translocation of $\alpha 5$ -GABA_ARs was primarily attributed to synaptic plasticity as, in this model, no change in tonic currents was observed. This observation emphasizes the importance of GABAergic synaptic plasticity but, clearly, does not exclude the involvement of plastic changes of tonic drive in learning and memory. Verification to what extent this type of tonic current plas-

ticity is involved in cognition would require experimental design enabling to manipulate specifically the extrasynaptic pool of $\alpha 5$ -containing GABA_ARs, which might be methodologically challenging.

In conclusion, we provide evidence that the induction of GABAergic plasticity is associated with plastic changes leading to up-regulation of tonic inhibition in hippocampal pyramidal neurons. This plasticity is specifically associated with an increased presence of $\alpha 5$ -containing GABA_ARs in the plasma membrane, which emerge as a key player in a variety of plasticity mechanisms concerning both inhibitory and excitatory drives.

ACKNOWLEDGEMENTS

The research was supported by the National Science Center (NCN) grant UMO-2018/31/B/NZ4/01998. *Authors contribution:* M.W. – conducted experiments, data analysis, contributed to writing and editing of the manuscript; K.L. – contributed to experimental design, data analysis and manuscript editing; J.W.M. – conceived and supervised the project, procured financial support, participated in designing the experiments, data analysis, wrote and edited the final version of the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

Declarations of interest: none.

REFERENCES

- Atack JR, Bayley PJ, Seabrook GR, Wafford KA, McKernan RM, Dawson GR (2006) L-655,708 enhances cognition in rats but is not proconvulsant at a dose selective for $\alpha 5$ -containing GABA_A receptors. *Neuropharmacology* 51:1023–1029. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.04.018>.
- Behlke LM, Foster RA, Liu J, Benke D, Benham RS, Nathanson AJ, Yee BK, Zehlhofer HU, et al. (2016) A pharmacogenetic, “restriction-of-function” approach reveals evidence for anxiolytic-like actions mediated by $\alpha 5$ -containing GABA_A receptors in mice. *Neuropsychopharmacology* 41:2492–2501. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.49>.
- Brickley S, Mody I (2012) Extrasynaptic GABA_A receptors: their function in the CNS and implications for disease. *Neuron* 73:23–34. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.12.012>.
- Bright DP, Smart TG (2013) Methods for recording and measuring tonic GABA_A receptor-mediated inhibition. *Front Neural Circuits* 7:1–13. <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00193>.
- Caraiscos VB, Elliott EM, You-Ten KE, Cheng YY, Belelli D, Newell JG, Jackson MF, Lambert JJ, et al. (2004) Tonic inhibition in mouse hippocampal CA1 pyramidal neurons is mediated by $\alpha 5$ subunit-containing γ -aminobutyric acid type A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3662–3667. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307231101>.
- Chandra D, Jia F, Liang J, Peng Z, Suryanarayana A, Werner DF, Spiegelman I, Houser CR, et al. (2006) GABA_A receptor $\alpha 4$ subunits mediate extrasynaptic inhibition in thalamus and dentate gyrus and the action of gaboxadol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:15230–15235. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604304103>.
- Cheng YY, Martin LJ, Elliott EM, Kim JH, Mount HTJ, Taverna FA, Roder JC, MacDonald JF, et al. (2006) $\alpha 5$ GABA_A receptors mediate the amnesic but not sedative-hypnotic effects of the general anesthetic etomidate. *J Neurosci* 26:3713–3720. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5024-05.2006>.
- Chiu CQ, Mattenson JS, Yamazaki M, Natsume R, Sakimura K, Tomita S, Tavalin SJ, Higley MJ (2018) Input-specific NMDAR-dependent potentiation of dendritic GABAergic inhibition. *Neuron* 97:368–377.e3. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.12.032>.
- Collinson N, Kuenzi FM, Jarolimik W, Maubach KA, Cothill R, Sur C, Smith A, Otu FM, et al. (2002) Enhanced learning and memory and altered GABAergic synaptic transmission in mice lacking the $\alpha 5$ subunit of the GABA_A receptor. *J Neurosci* 22:5572–5580. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-13-05572.2002>.
- Crestani F, Keist R, Fritschy JM, Benke D, Vogt K, Prüt L, Blüthmann H, Möhler H, Rudolph U (2002) Trace fear conditioning involves hippocampal $\alpha 5$ GABA_A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8980–8985. <https://doi.org/10.1073/pnas.142288599>.
- Cushman JD, Moore MD, Olsen RW, Fanselow MS (2014) The role of the δ GABA_A receptor in ovarian cycle-linked changes in hippocampus-dependent learning and memory. *Neurochem Res* 39:1140–1146. <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1282-6>.
- Davenport CM, Rajappa R, Katchan L, Taylor CR, Tsai MC, Smith CM, de Jong JW, Arnold DB, et al. (2020) Relocation of an extrasynaptic GABA_A receptor to inhibitory synapses freezes excitatory synaptic strength and preserves memory. *Neuron* 109:123–134.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.09.037>.
- Farrant M, Nusser Z (2005) Variations on an inhibitory theme: Phasic and tonic activation of GABA_A receptors. *Nat Rev Neurosci* 6:215–229. <https://doi.org/10.1038/nrn1625>.
- Field M, et al. (2020) A physiological role for GABA_A receptor desensitization – induction of long-term potentiation at inhibitory synapses. *bioRxiv* 2020.06.02.128900.
- Glykys J, Marn EO, Mody I (2008) Which GABA_A receptor subunits are necessary for tonic inhibition in the hippocampus? *J Neurosci* 28:1421–1426. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4751-07.2008>.
- Glykys J, Mody I (2007a) The main source of ambient GABA responsible for tonic inhibition in the mouse hippocampus. *J Physiol* 582:1163–1178. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.134460>.
- Glykys J, Mody I (2007b) Activation of GABA_A receptors: views from outside the synaptic cleft. *Neuron* 56:763–770. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.11.002>.
- Hausrat TJ, Muhlia M, Genow K, Thomas P, Hirdes W, Tsukita S, Heisler FF, Herich L, et al. (2015) Radixin regulates synaptic GABA_A receptor density and is essential for reversal learning and short-term memory. *Nat Commun* 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms7872>.
- Lebeda K, Mozzyńska JW (2017) Spike timing-dependent plasticity in the mouse barrel cortex is strongly modulated by sensory learning and depends on activity of matrix metalloproteinase 9. *Mol Neurobiol* 54:6723–6736. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0174-y>.
- Lee V, MacKenzie G, Hooper A, Maguire J (2016) Reduced tonic inhibition in the dentate gyrus contributes to chronic stress-induced impairments in learning and memory. *Hippocampus* 26:1276–1290. <https://doi.org/10.1002/hipo.22604>.
- Lerma J, Herranz AS, Herreras O, Abaira V, del Río RM (1986) In vivo determination of extracellular concentration of amino acids in the rat hippocampus. A method based on brain dialysis and computerized analysis. *Brain Res* 384:145–155. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)91230-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)91230-8).
- Loeblich S, Bähring R, Katsuno T, Tsukita S, Kneussel M (2006) Activated radixin is essential for GABA_A receptor $\alpha 5$ subunit anchoring at the actin cytoskeleton. *EMBO J* 25:987–999. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600995>.
- Marsden KC, Shemesh A, Bayer KU, Carroll RC (2010) Selective translocation of Ca²⁺/calmodulin protein kinase II α (CaMKII α) to inhibitory synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:20559–20564. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010346107>.
- Marsden KC, Beattie JB, Friedenthal J, Carroll RC (2007) NMDA receptor activation potentiates inhibitory transmission through GABA_A receptor-associated protein-dependent exocytosis of GABA_A receptors. *J Neurosci* 27:14326–14337. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4433-07.2007>.

- Martin LJ, Oh GHT, Orser BA (2009) Etomidate targets $\alpha 5$ γ -aminobutyric acid subtype A receptors to regulate synaptic plasticity and memory blockade. *Anesthesiology* 111:1025–1035. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e31819bc981>.
- Mody I, Pearce RA (2004) Diversity of inhibitory neurotransmission through GABAA receptors. *Trends Neurosci* 27:569–575. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.07.002>.
- Möhler H, Rudolph U (2017) Disinhibition, an emerging pharmacology of learning and memory. *F1000Res*, 6:1–10. DOI: 10.12688/f1000research.9947.1.
- Mortensen M, Smart TG (2006) Extrasynaptic $\alpha 5$ subunit GABAA receptors on rat hippocampal pyramidal neurons. *J Physiol* 577:841–856. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.117952>.
- Navarro JF, Burdó E, Martín-López M (2002) Anxiogenic-like activity of L-655,708, a selective ligand for the benzodiazepine site of GABAA receptors which contain the $\alpha 5$ subunit, in the elevated plus-maze test. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 26:1389–1392. [https://doi.org/10.1016/S0278-5846\(02\)00005-6](https://doi.org/10.1016/S0278-5846(02)00005-6).
- Petrini EM, Ravasenga T, Hausat TJ, Iurilli G, Oloese U, Racine V, Sibarita J-B, Jacob TC, et al. (2014) Synaptic recruitment of gephyrin regulates surface GABA A receptor dynamics for the expression of inhibitory LTP. *Nat Commun* 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms4921>.
- Prenosil GA, Schneider Gasser EM, Rudolph U, Keist R, Fritschy JM, Vogt KE (2006) Specific subtypes of GABA A receptors mediate phasic and tonic forms of inhibition in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 96:846–857. <https://doi.org/10.1152/jn.01199.2006>.
- Quirk K, Blurton P, Fletcher S, Leeson P, Tang F, Mellilo D, Ragan CI, McKernan RM (1996) [3H]L-655,708, a novel ligand selective for the benzodiazepine site of GABA(A) receptors which contain the $\alpha 5$ subunit. *Neuropharmacology*, 35:1331–1335. DOI: 10.1016/S0028-3908(96)00061-5.
- Rodgers FC, Zamowska ED, Laha KT, Engin E, Zeller A, Keist R, Rudolph U, Pearce RA (2015) Etomidate impairs long-term potentiation in vitro by targeting $\alpha 5$ -subunit containing GABAA receptors on nonpyramidal cells. *J Neurosci* 35:9707–9716. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0315-15.2015>.
- Saab BJ, MacLean AJB, Kanisek M, Zurek AA, Martin LJ, Roder JC, Orser BA (2010) Short-term memory impairment after isoflurane in mice is prevented by the $\alpha 5$ γ -aminobutyric acid type A receptor inverse agonist L-655,708. *Anesthesiology* 113:1061–1071. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e3181f56228>.
- Schütz JM, Knoflach F, Hernandez MC, Bischofberger J (2018) Dendrite-targeting interneurons control synaptic NMDA-receptor activation via nonlinear $\alpha 5$ -GABA_A receptors. *Nat Commun* 9 (3576). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06004-6>.
- Scimemi A, Andersson A, Heeroma JH, Strandberg J, Rydenhag B, McEvoy AW, Thom M, Asztely F, et al. (2006) Tonic GABAA receptor-mediated current in human brain. *Eur J Neurosci* 24:1157–1160. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04989.x>.
- Serwanski DR, Miralles CP, Christie SB, Mehta AK, Li X, De Blas AL (2006) Synaptic and nonsynaptic localization of GABAA receptors containing the $\alpha 5$ subunit in the rat brain. *J Comp Neurol* 499:458–470. <https://doi.org/10.1002/cne.21115>.
- Shi MM, Fan KM, Qiao YN, Xu JH, Qiu LJ, Li X, Liu Y, Qian ZQ, et al. (2020) Hippocampal μ -opioid receptors on GABAergic neurons mediate stress-induced impairment of memory retrieval. *Mol Psychiatry* 25:977–992. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0435-z>.
- Urban-Ciecko J, Kossut M, Mozrzymas JW (2010) Sensory learning differentially affects GABAergic tonic currents in excitatory neurons and fast spiking interneurons in layer 4 of mouse barrel cortex. *J Neurophysiol* 104(2):746–754. <https://doi.org/10.1152/jn.00988.2009>.
- Urban-Ciecko J, Mozrzymas JW (2011) Sex-specificity of associative learning-induced changes in GABAergic tonic inhibition in layer 4 neurons of mouse barrel cortex. *Behav Brain Res* 219:373–377. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.01.013>.
- Vargas-Caballero M, Martin LJ, Salter MW, Orser BA, Paulsen O (2010) $\alpha 5$ Subunit-containing GABAA receptors mediate a slowly decaying inhibitory synaptic current in CA1 pyramidal neurons following Schaffer collateral activation. *Neuropharmacology* 58:668–675. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.11.005>.
- Wang DS, Zurek A, Lecker I, Yu J, Abramian A, Avramescu S, Davies P, Moss S, et al. (2012) Memory deficits induced by inflammation are regulated by $\alpha 5$ -subunit-containing GABAA receptors. *Cell Rep* 2:488–496. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.08.022>.
- Whissell PD, Rosenzweig S, Lecker I, Wang D-S, Wojtowicz JM, Orser BA (2013) γ -aminobutyric acid type A receptors that contain the δ subunit promote memory and neurogenesis in the dentate gyrus. *Ann Neurol* 74:611–621. <https://doi.org/10.1002/ana.23941>.
- Wiera G, Lebida K, Lech AM, Brzdęk P, Van Hove I, De Groef L, Moons L, Petrini EM, et al. (2020) Long-term plasticity of inhibitory synapses in the hippocampus and spatial learning depends on matrix metalloproteinase 3. *Cell Mol Life Sci* 78:2279–2298. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03640-6>.
- Wisden W, Cope D, Klausberger T, Hauer B, Sinkkonen ST, Treier V, Lujan R, Jones A, et al. (2002) Ectopic expression of the GABAA receptor $\alpha 6$ subunit in hippocampal pyramidal neurons produces extrasynaptic receptors and an increased tonic inhibition. *Neuropharmacology* 43:530–549. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(02\)00151-X](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(02)00151-X).
- Xu MY, Wong AHC (2018) GABAergic inhibitory neurons as therapeutic targets for cognitive impairment in schizophrenia. *Acta Pharmacol Sin* 39(5):733–753. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.172>.
- Yap E-L, Pettit NL, Davis CP, Nagy MA, Harmin DA, Golden E, Dagliyan O, Lin C, et al. (2021) Bidirectional perisomatic inhibitory plasticity of a Fos neuronal network. *Nature* 590:115–121. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-3031-0>.
- Yee BK, Hauser J, Dolgov VV, Keist R, Möhler H, Rudolph U, Feldon J (2004) GABAA receptors containing the $\alpha 5$ subunit mediate the trace effect in aversive and appetitive conditioning and extinction of conditioned fear. *Eur J Neurosci* 20:1928–1936. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03642.x>.
- Zamowska ED, Keist R, Rudolph U, Pearce RA (2009) GABAA receptor $\alpha 5$ subunits contribute to GABA_A slow synaptic inhibition in mouse hippocampus. *J Neurophysiol* 101 (3):1179–1191. <https://doi.org/10.1152/jn.91203.2008>.
- Zamowska ED, Rodgers FC, Oh I, Rau V, Lor C, Laha KT, Jurd R, Rudolph U, et al. (2015) Etomidate blocks LTP and impairs learning but does not enhance tonic inhibition in mice carrying the N265M point mutation in the beta3 subunit of the GABAA receptor. *Neuropharmacology* 93:171–178. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.01.011>.
- Zurek AA, Bridgwater EM, Orser BA (2012) Inhibition of $\alpha 5$ γ -aminobutyric acid type A receptors restores recognition memory after general anesthesia. *Anesth Analg* 114:845–855. <https://doi.org/10.1213/ANE.0b013e31824720da>.
- Zurek AA, Yu J, Wang D-S, Haffey SC, Bridgwater EM, Penna A, Lecker I, Lei G, Chang T, et al. (2014) Sustained increase in $\alpha 5$ GABA_A receptor function impairs memory after anesthesia. *J Clin Invest* 124:5437–5441. <https://doi.org/10.1172/JCI76669>.

(Received 24 March 2021, Accepted 17 May 2021)
(Available online 24 May 2021)

2.

“Bidirectional plasticity of GABAergic tonic inhibition in hippocampal somatostatin- and parvalbumin-containing interneurons”

Marcin Wyroślak, Grzegorz Dobrzański, Jerzy W. Mozrzymas

Frontiers in Cellular Neuroscience 17:1193383 (2023)

doi: 10.3389/fncel.2023.1193383



OPEN ACCESS

EDITED BY
Stanley A. Thayer,
University of Minnesota, United StatesREVIEWED BY
Maria-Clemencia Hernandez,
Roche Innovation Center, Switzerland
Enrico Sanna,
University of Cagliari, Italy*CORRESPONDENCE
Marcin Wyroślak
✉ marcin.wyroslak@365.student.umw.edu.plRECEIVED 24 March 2023
ACCEPTED 05 June 2023
PUBLISHED 28 June 2023CITATION
Wyroślak M, Dobrzański G and Mozrzymas JW
(2023) Bidirectional plasticity of GABAergic
tonic inhibition in hippocampal somatostatin-
and parvalbumin-containing interneurons.
Front. Cell. Neurosci. 17:1193383.
doi: 10.3389/fncel.2023.1193383COPYRIGHT
© 2023 Wyroślak, Dobrzański and Mozrzymas.
This is an open-access article distributed under
the terms of the [Creative Commons Attribution
License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or
reproduction in other forums is permitted,
provided the original author(s) and the
copyright owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is cited, in
accordance with accepted academic practice.
No use, distribution or reproduction is
permitted which does not comply with these
terms.

Bidirectional plasticity of GABAergic tonic inhibition in hippocampal somatostatin- and parvalbumin-containing interneurons

Marcin Wyroślak ^{1*}, Grzegorz Dobrzański² and
Jerzy W. Mozrzymas¹¹Department of Biophysics and Neuroscience, Wrocław Medical University, Wrocław, Poland, ²Nencki
Institute of Experimental Biology, Warsaw, Poland

GABA_A receptors present in extrasynaptic areas mediate tonic inhibition in hippocampal neurons regulating the performance of neural networks. In this study, we investigated the effect of NMDA-induced plasticity on tonic inhibition in somatostatin- and parvalbumin-containing interneurons. Using pharmacological methods and transgenic mice (SST-Cre/PV-Cre x Ai14), we induced the plasticity of GABAergic transmission in somatostatin- and parvalbumin-containing interneurons by a brief (3 min) application of NMDA. In the whole-cell patch-clamp configuration, we measured tonic currents enhanced by specific agonists (etomidate or gaboxadol). Furthermore, in both the control and NMDA-treated groups, we examined to what extent these changes depend on the regulation of distinct subtypes of GABA_A receptors. Tonic conductance in the somatostatin-containing (SST+) interneurons is enhanced after NMDA application, and the observed effect is associated with an increased content of $\alpha 5$ -containing GABA_ARs. Both fast-spiking and non-fast-spiking parvalbumin-positive (PV+) cells showed a reduction of tonic inhibition after plasticity induction. This effect was accompanied in both PV+ interneuron types by a strongly reduced proportion of δ -subunit-containing GABA_ARs and a relatively small increase in currents mediated by $\alpha 5$ -containing GABA_ARs. Both somatostatin- and parvalbumin-containing interneurons show cell type-dependent and opposite sign plasticity of tonic inhibition. The underlying mechanisms depend on the cell-specific balance of plastic changes in the contents of $\alpha 5$ and δ subunit-containing GABA_ARs.

KEYWORDS

GABA, tonic inhibition, hippocampus, interneurons, plasticity, extrasynaptic receptors

Highlights

- NMDA induces plastic changes of tonic inhibition in hippocampal interneurons
- Tonic current plasticities in SST+ and PV+ interneurons show opposite directions
- $\alpha 5$ - and δ -GABA_AR contents were altered upon plasticity induction

1. Introduction

GABAergic inhibition consists of two major components: tonic and phasic drives. While phasic signaling has been mediated by GABA_A receptors (GABA_ARs) located at postsynaptic densities, tonic inhibition (TI) relies on high-affinity receptors present in the extrasynaptic regions (Farrant and Nusser, 2005). Ambient GABA can activate extrasynaptic GABA_ARs and cause their persistent conductance at low, often submicromolar concentrations (Lerma et al., 1986; Kaneda et al., 1995; Brickley et al., 1996). Receptors that mediate tonic inhibition typically include $\alpha(4-6)$, β , δ (for $\alpha4/6$), or γ (for $\alpha5$) subunits, but it needs to be considered that distinct types of neurons in various brain regions may express GABA_ARs with different subunit stoichiometry (Caraiscos et al., 2004; Serwanski et al., 2006; Glykys et al., 2008; Brickley and Mody, 2012; Field et al., 2021). Importantly, a growing body of evidence has demonstrated that TI plays an important role in learning and memory depending on the hippocampus. Moreover, the use of knockout *Gabra5*($-/-$) mice showed that the GABA_AR-containing $\alpha5$ subunit was involved in modulating the hippocampal-dependent memory (Martin et al., 2009). The δ subunit was present in the hippocampus, although its expression depends on the neuronal type (Sun et al., 2004; Mangan et al., 2005; Glykys et al., 2008), and it has been shown that δ subunit-containing GABA_ARs are essential in learning and memory formation (Whissell et al., 2013a; Cushman et al., 2014).

For decades, research on excitatory glutamatergic synaptic plasticity was the primary focus; but in the past years, there has been a significant increase in interest in GABAergic inhibitory plasticity. Examples of NMDAR-dependent GABAergic plasticity have been described in the cerebral cortex (Chiu et al., 2018) and in the hippocampus (Marsden et al., 2007; Wiera et al., 2021, 2022). Moreover, several studies have shown that $\alpha5$ subunit-containing GABA_ARs were involved in the regulation of glutamatergic plasticity (Cheng et al., 2006; Ballard et al., 2009; Martin et al., 2010; Davenport et al., 2021). One of our recent studies indicates the involvement of tonically active $\alpha5$ -containing GABA_ARs in the NMDA-induced plastic changes of the tonic inhibition in the pyramidal cells (Wyroślak et al., 2021). However, the abovementioned evidence was based on recordings primarily from pyramidal neurons. It is thus appealing to explore the plasticity of the tonic drive in GABAergic interneurons, which show a large diversity in innervating patterns of the principal cells and other interneurons (Pelkey et al., 2017). We thus decided to address the issue of tonic inhibition plasticity at distinct types of interneurons, known to play a crucial role in regulating the hippocampal neuronal network. Parvalbumin-containing (PV+ INs) and somatostatin-containing (SST+ INs) interneurons were known to have a profound impact on hippocampal activity while innervating distinct parts of pyramidal neurons—PV+ INs—perisomatic, SST+ INs—distal dendrites (Figure 4 and also Pelkey et al., 2017). Recent studies have shown that parvalbumin-containing interneurons are critical in memory consolidation by the coordination of neural network dynamics (Donato et al., 2013; Ognjanovski et al., 2017; Udakis et al., 2020). Moreover, SST+ INs were found to play an important role in regulating neuronal activity, plasticity, and pathology (Leão et al., 2012; Honoré et al., 2021; Asgarihafshejani et al., 2022; Liguz-lecznar et al., 2022). We

report here that brief NMDA stimulation induces in these INs the cell type-specific plastic changes in tonic inhibition with opposite signs (PV+ INs – reduction, SST+ INs – potentiation). While the plasticity in PV+ INs appears to be associated primarily with the reduction of the tonically active δ subunit-containing GABA_ARs in SST+ INs, it results in an increased content of $\alpha5$ GABA_ARs in GABAergic tonic inhibition.

2. Materials and methods

2.1. Ethical approval

All animal care and experimental procedures were conducted in the animal facility of the Wrocław Medical University in accordance with the European Community Council Directive (2010/63/UE). Before decapitation, mice were anesthetized with isoflurane. All efforts were made to minimize the number of animals used.

2.2. Animals

Animals were housed on a natural light/dark cycle (12/12 h) with food and water *ad libitum*. Experiments were performed on 18–25-day-old mice of either sex. Wild-type mice and homozygous knock-in mice expressing Cre recombinase (PV-Cre; JAX 017320 and SST-Cre; JAX 028864) crossed with Rosa26-tdTomato reporter mice (Ai14; JAX 007914) were used.

2.3. Brain slices preparation

Mice were anesthetized with isoflurane and then euthanized by decapitation. Brains were placed in a cold artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing 119 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1 mM NaH₂PO₄, 26.3 mM NaHCO₃, 1.3 mM MgSO₄, 2.5 mM CaCl₂, and 11 mM glucose, and a pH of 7.4 bubbled with carbogen (95% O₂ + 5% CO₂). Brains were cut with a vibratome (Leica VT1200S, Germany) into 350- μ m-thick transverse slices, in which the hippocampus was easily visible. After sectioning, slices were transferred to a recovery chamber containing aCSF for at least 1 h before electrophysiological experiments.

2.4. Drugs

The following drugs were purchased from Tocris Bioscience (UK) and were used during the experiments: 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX; selective blocker of non-NMDA glutamate receptors), tetrodotoxin (TTX; sodium channel selective blocker), gaboxadol (THIP; superagonist for δ -containing extrasynaptic GABA_ARs), etomidate (enhancer of $\beta2/3$ -containing GABA_ARs), L-655,708 (selective inverse agonist for $\alpha5$ -containing GABA_ARs), picrotoxin (PTX; non-specific GABA_ARs antagonist), and N-methyl-D-aspartic acid (NMDA; NMDARs selective agonist). The stock solutions of etomidate, L-655,708, and picrotoxin were dissolved in dimethyl sulfoxide

(DMSO, Sigma) and then added into the ACSF during experiments [not exceeding the concentrations of DMSO > 0.1% v/v (see Lebeda and Mozrzykas, 2017)].

2.5. Electrophysiological recordings and data analysis

Prior to measurements, slices were transferred to a recording chamber perfused with oxygenated aCSF at a flow rate of 2.0–3.0 ml/min at room temperature. Both, parvalbumin- and somatostatin-containing interneurons were identified based on tdTomato expression visualized by fluorescence microscopy equipped with Lambda DG-4, an illumination system designed for a rapid change in wavelength (Sutter Instrument).

PV+ interneurons were searched in the stratum pyramidale as cells with large, pyramidally shaped or bitufted dendritic trees. Interneurons were classified as fast-spiking INs if high firing frequency (67.88 ± 3.26 Hz), narrow spike half widths (0.62 ± 0.03 ms), and short membrane time constants (9.62 ± 1.35 ms) are displayed. Non-fast-spiking interneurons were characterized by lower firing frequencies (21.54 ± 1.81 Hz), wider spike half widths (1.32 ± 0.03 ms), and longer membrane time constants (23.10 ± 1.24 ms) (Pelkey et al., 2017). The membrane and firing properties for all considered interneurons are summarized in Table 1. A sag ratio was calculated from a voltage response to -200 pA using $[(1 - \Delta V_{ss}/\Delta V_{max}) \times 100\%]$ as described by Song et al. (2015). The threshold for action potential generation was defined as the value of the cell membrane potential at which $dV/dt = 20$ mV/ms. The afterhyperpolarization (AHP) amplitude was determined as the difference between the action potential threshold and the least positive membrane potential immediately after the first action potential. SST+ interneurons were located in CA1 stratum oriens, parallel to the stratum pyramidale, with an apparently expanded dendritic tree. Patch-clamp recordings of tonic currents were performed in the whole-cell configuration using borosilicate patch pipettes filled with an intracellular solution containing: 10 mM potassium gluconate, 125 mM KCl, 1 mM EGTA, 10 mM HEPES, 4 mM MgATP, 5 mM sucrose, pH 7.25, 295 mOsm (Marsden et al., 2007) which had a resistance of 2.5–4.5 M Ω (when filled with internal saline). Recordings were digitized at 20 kHz and filtered at 6 kHz using a Multi-Clamp 700B amplifier and Axon Digidata 1550 (Molecular Devices).

After firing pattern recordings, TTX (1 μ M) and DNQX (20 μ M) were used to block action potentials dependent on voltage-gated sodium channels and AMPA-type glutamate receptors. These compounds remained in the measuring chamber until the end of the experiment. Furthermore, we induced plasticity in studied groups of cells by treating the slice for 3 min with 20 μ M NMDA. After a stable 20 min, measurement after NMDA washout, gaboxadol (1 μ M), or etomidate (5 μ M) was used to enhance tonic current in PV+ and SST+ interneurons. In the final part of the experiments, PTX (100 μ M) was administered to silence GABAergic transmission.

In this study, miniature inhibitory postsynaptic currents (mIPSCs) were excluded from the analysis to precisely determine the magnitude of tonic currents (as recommended in

Bright and Smart, 2013). The tonic current density was determined from the current shift following PTX application, normalized to the whole-cell membrane capacitance (C_m). The capacitance of the cell membrane was determined as a ratio of the membrane time constant and the input resistance. The membrane time constant was estimated from the exponential fit to the time course of the membrane voltage (in current-clamp mode) in response to a small -25 pA hyperpolarizing current (Urban-Ciecko et al., 2010; Wyroślak et al., 2021). Access and input resistances were monitored during the recordings. Cells were discarded from further analysis if the monitored resistances changed by >20%.

To evaluate the contribution of $\alpha 5$ GABA_ARs in the total tonic density values, after etomidate/gaboxadol administration, we additionally used L-655,708 before the application of PTX. The proportion of current mediated by $\alpha 5$ GABA_ARs was calculated for each cell as $\Delta I_{L-655,708}/(\Delta I_{L-655,708} + \Delta I_{PTX})$, where $\Delta I_{L-655,708}$ and ΔI_{PTX} are current reductions following the administration of L-655,708 and PTX, respectively. To ensure the specificity of action on $\alpha 5$ -GABA_ARs, a low concentration of L-655,708 of 20 nM was used as its higher concentrations might affect the activity of other synaptic or extrasynaptic GABA_ARs (Atack et al., 2006; Vargas-Caballero et al., 2010).


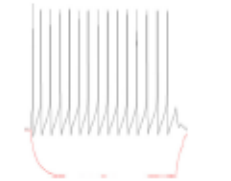

2.6. Experimental design and analysis

Studies were designed to generate equal-size groups, and the brain slices were randomized for treatment. Brain slices were isolated from both male and female subjects in each considered group. The results were combined because there were no differences or trends between the sexes. The group size (n) for each group was collected to obtain a relevant power of the statistical analysis ($\beta > 0.8$). Group sizes indicate the number of experimentally determined values (each value refers to one cell in a separate brain slice). SigmaPlot (Systat software) was used to perform data analysis. Data on the plots are presented as mean \pm SEM. The data was checked for normal distributions (Kolmogorov-Smirnov test) and equal variances (Levene median test). Comparisons were performed using unpaired or paired Student's t -test. Differences were considered statistically significant when the value of $p < 0.05$ was obtained. Randomization or blinding of the operator or data analysis was not undertaken due to the nature of the experiments.

3. Results

In our previous study (Wyroślak et al., 2021), we found that brief (3 min) NMDA treatment induced plasticity of tonic GABAergic currents in the pyramidal neurons. We thus applied an analogous protocol to investigate the plasticity of tonic conductance in three subtypes of interneurons: somatostatin-positive and two types of parvalbumin-containing cells: fast-spiking and non-fast spiking. Because of relatively intense superfusion of slices with aCSF, which is expected to reduce the ambient GABA (Glykys and Mody, 2007; Mody et al., 2007), we have used protocols to enhance tonic currents with etomidate or gaboxadol as also

TABLE 1 Summary of intrinsic membrane and firing properties of SST+, fast-spiking, and non-fast-spiking interneurons.

Property	SST + INs (n = 37)	PV + fast spiking INs (n = 36)	PV+ non-fast-spiking INs (n = 37)
RMP (mV)	-55.72 ± 1.67	-54.42 ± 1.01	-59.19 ± 2.28
Membrane time constant (ms)	45.52 ± 2.17	9.62 ± 1.35	23.10 ± 1.24
Firing frequency (Hz)	40.78 ± 2.31	67.88 ± 3.26	21.54 ± 1.81
AP amplitude (mV)	71.45 ± 1.29	57.92 ± 2.37	83.01 ± 2.22
Spike half-width (ms)	0.87 ± 0.02	0.62 ± 0.03	1.32 ± 0.03
Sag ratio	16.29 ± 2.34	6.12 ± 0.58	13.38 ± 0.87
AHP amplitude (mV)	-26.05 ± 0.85	-23.82 ± 1.02	-9.81 ± 0.77
AP threshold (mV)	-42.02 ± 0.75	-39.32 ± 1.36	-42.15 ± 1.15
Membrane capacitance (pF)	84.76 ± 4.46	80.93 ± 5.88	118.82 ± 7.89
Firing pattern			

Data are represented as mean ± SEM.

practiced in our previous (Wyroślak et al., 2021) and other studies (Martin et al., 2009; Rodgers et al., 2015; Zarnowska et al., 2015).

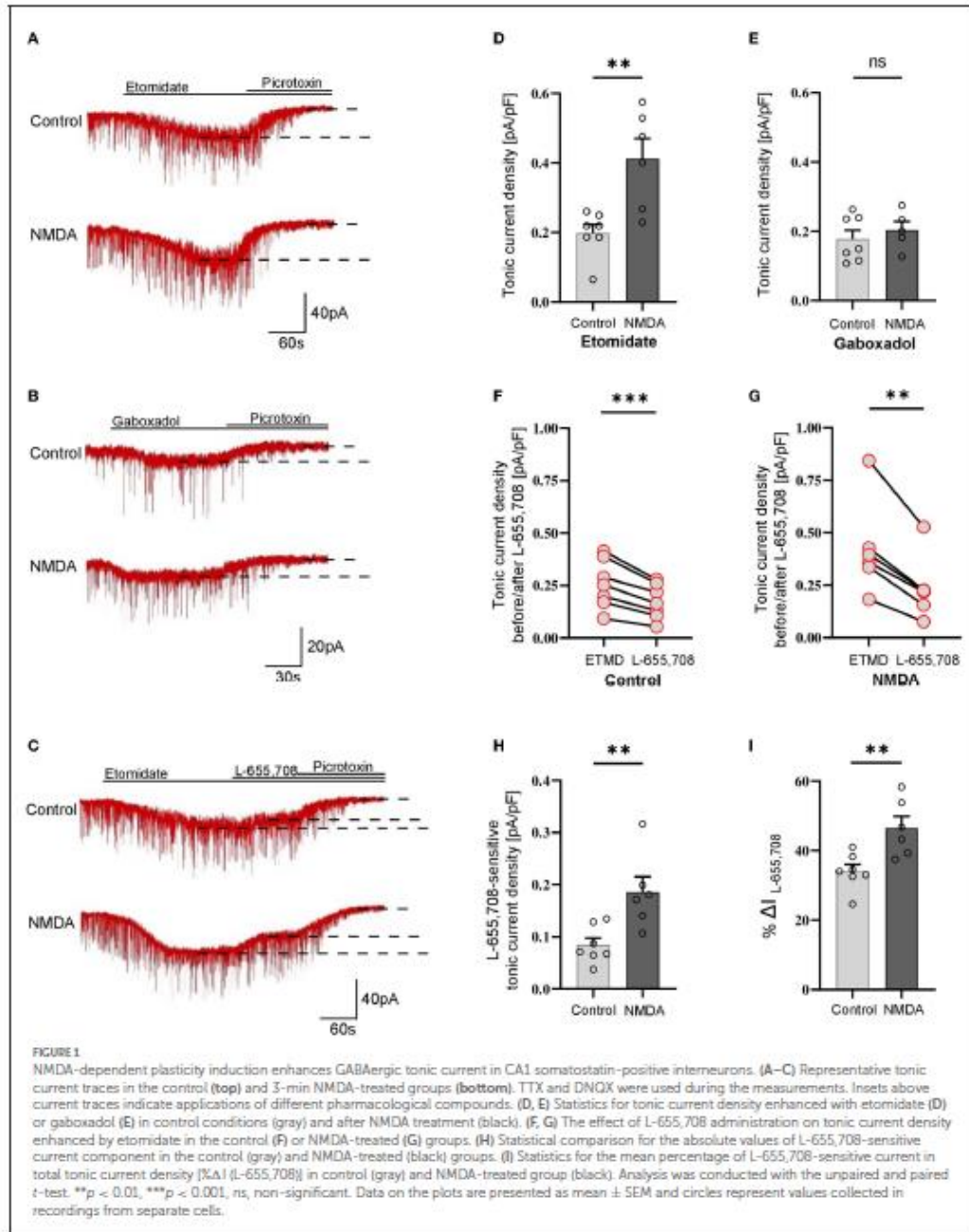
3.1. Transient activation of NMDARs enhances tonic current in SST+ interneurons

As explained above, tonic currents were enhanced either with etomidate (5 μM) or gaboxadol (1 μM). The tonic current density was determined from the subtraction of the steady-state current measured upon PTX (100 μM) treatment from that evoked by etomidate (or gaboxadol) (Figures 1A, B) and by normalizing these values to the whole-cell membrane capacitance (Figures 1D–F). Interestingly, we found that the average etomidate-enhanced tonic current density was significantly increased by NMDA treatment (Control: 0.198 ± 0.07 pA/pF, n = 7; NMDA: 0.413 ± 0.14, n = 6; p = 0.004; Figures 1A, D). We used additionally gaboxadol instead of etomidate to check whether there is a component of plastic changes associated with GABA_ARs with δ subunit but we did not observe any significant difference between the control and NMDA-treated groups (Control: 0.178 ± 0.07, n = 7; NMDA: 0.204 ± 0.06, n = 5; p = 0.498; Figures 1B, E), indicating that δGABA_ARs are not involved in the tonic current plasticity in these neurons. Next, we sought to determine the contribution of α5GABA_ARs in observed plastic changes. To this end, we first elicited the tonic current with etomidate, and when it reached the steady state, a specific blocker of α5 subunit-containing GABA_ARs (L-655,708) was applied (Figure 1C). Administration of this compound resulted in a clear reduction of tonic currents both in the control (ETMD: 0.258 ± 0.04 pA/pF; L-655,708: 0.173 ± 0.03 pA/pF; n = 7; p

< 0.001; Figure 1F) and NMDA-treatment groups (EMTD: 0.424 ± 0.09 pA/pF; L-655,708: 0.238 ± 0.06 pA/pF; n = 6; p = 0.001; Figure 1G), but a significantly larger reduction of tonic current was observed in the NMDA group (Control: 0.084 ± 0.01 pA/pF, n = 7; NMDA: 0.186 ± 0.03 pA/pF, n = 6; p < 0.01; Figure 1H). Then, the fraction of current sensitive to L-655,708 (%ΔIL-655,708) was calculated as described in Methods, and as shown in Figure 1I, plasticity induction with NMDA was associated with significantly increased contribution of current mediated by the α5GABA_ARs [Control: 34.025 ± 1.95 %ΔI (L-655,708), n = 7; NMDA: 46.486 ± 3.35 %ΔI (L-655,708), n = 6; p < 0.05; Figure 1I]. We thus provide the first evidence that a brief NMDA treatment induced tonic current plasticity in SST+ interneurons and that these changes are related to increased content of α5GABA_ARs in the mediation of extrasynaptic GABAergic currents.

3.2. NMDA treatment reduces GABAergic tonic currents in parvalbumin-containing fast-spiking and non-fast-spiking interneurons

Analogous protocol as in the above-described experiments on SST-positive neurons was applied to check for the plasticity of tonic currents in parvalbumin-containing interneurons. As described in Methods, PV+ interneurons were divided into two groups: fast-spiking (Figure 2) and non-fast spiking (Figure 3). Contrary to SST+ interneurons, in the case of PV+ fast-spiking neurons, NMDA treatment resulted in a significant reduction of tonic current density (Control: 1.222 ± 0.16 pA/pF, n = 6; NMDA: 0.568 ± 0.21 pA/pF, n = 5; p = 0.001; Figures 2A, D). Interestingly, a



decrease in tonic current following NMDA application was also observed when gaboxadol was used (Control: 0.862 ± 0.22 , $n = 6$; NMDA: 0.275 ± 0.04 , $n = 6$; $p < 0.001$; Figures 2B, E), indicating

that the observed plasticity was associated with a reduced number of δ subunit-containing GABA_ARs in the plasma membrane. In addition, we checked the content of $\alpha 5$ GABA_ARs in tonic current

density measured from PV+ fast-spiking interneurons. As shown in Figure 2C, application of L-655,708 reduced the tonic current both in control conditions (ETMD: 0.875 ± 0.09 pA/pF; L-655,708: 0.726 ± 0.08 pA/pF; $n = 7$; $p < 0.001$; Figure 2F) and after NMDA treatment (ETMD: 0.598 ± 0.06 pA/pF; L-655,708: 0.339 ± 0.05 pA/pF; $n = 6$; $p < 0.001$; Figure 2G). Interestingly, a significantly larger extent of tonic current reduction was observed in the NMDA group (Control: 0.149 ± 0.02 pA/pF, $n = 7$; NMDA: 0.259 ± 0.04 pA/pF, $n = 6$; $p = 0.014$; Figure 2H), indicating that plasticity induction increases the pool of $\alpha 5$ GABA_ARs in this type of PV+ interneurons. Moreover, as shown in Figure 2I, brief NMDA treatment significantly augmented the mean percentage of L-655,708-sensitive component measured as % Δ I (L-655,708) (Control: 17.229 ± 1.39 , $n = 7$; NMDA: 44.223 ± 4.70 , $n = 6$; $p < 0.001$; Figure 2I), and the increase in % Δ I (L-655,708) appeared to be larger than that for the absolute value of L-655,708-sensitive current (compare Figures 2H, I). Thus, while plasticity induction with NMDA in PV+ fast-spiking interneurons resulted in an overall reduction of tonic current (enhanced by etomidate), its component mediated by δ subunit-containing receptors strongly decreased but the intensity of current attributed to $\alpha 5$ GABA_ARs increased.

Analogous analysis of tonic current plasticity has been performed for PV+ cells characterized as non-fast-spiking interneurons. Tonic currents enhanced with etomidate were significantly reduced by NMDA treatment (Control: 0.479 ± 0.19 pA/pF, $n = 8$; NMDA: 0.271 ± 0.09 pA/pF, $n = 5$; $p = 0.041$; Figures 3A, D), and a similar effect was observed for currents mediated by δ GABA_ARs activated by gaboxadol (Control: 0.381 ± 0.08 pA/pF, $n = 6$; NMDA: 0.267 ± 0.05 pA/pF, $n = 6$; $p = 0.017$; Figures 3B, E). Application of L-655,708 reduced the tonic current both in the control (EMTD: 0.692 ± 0.22 pA/pF; L-655,708: 0.620 ± 0.20 pA/pF; $n = 6$; $p = 0.004$; Figure 3F) and NMDA-treated groups (EMTD: 0.486 ± 0.06 pA/pF; L-655,708: 0.331 ± 0.03 pA/pF; $n = 6$; $p = 0.002$; Figure 3G), and the extent of reduction was larger in the NMDA group (Control: 0.072 ± 0.01 pA/pF, $n = 6$; NMDA: 0.156 ± 0.03 pA/pF, $n = 6$; $p = 0.016$; Figure 3H), indicating that plasticity induction upregulated $\alpha 5$ GABA_ARs. In PV+ non-fast-spiking interneurons, NMDA treatment resulted in an increased proportion of $\alpha 5$ GABA_ARs [% Δ I(L-655,708)] in the tonic currents (Control: 10.483 ± 1.95 , $n = 6$; NMDA: 31.105 ± 2.62 , $n = 6$; $p < 0.001$; Figure 3I), and similar to what observed for fast-spiking PV+ interneurons, the increase in % Δ I (L-655,708) appeared to be larger than that for the absolute value of L-655,708-sensitive current (compare Figures 3H, I).

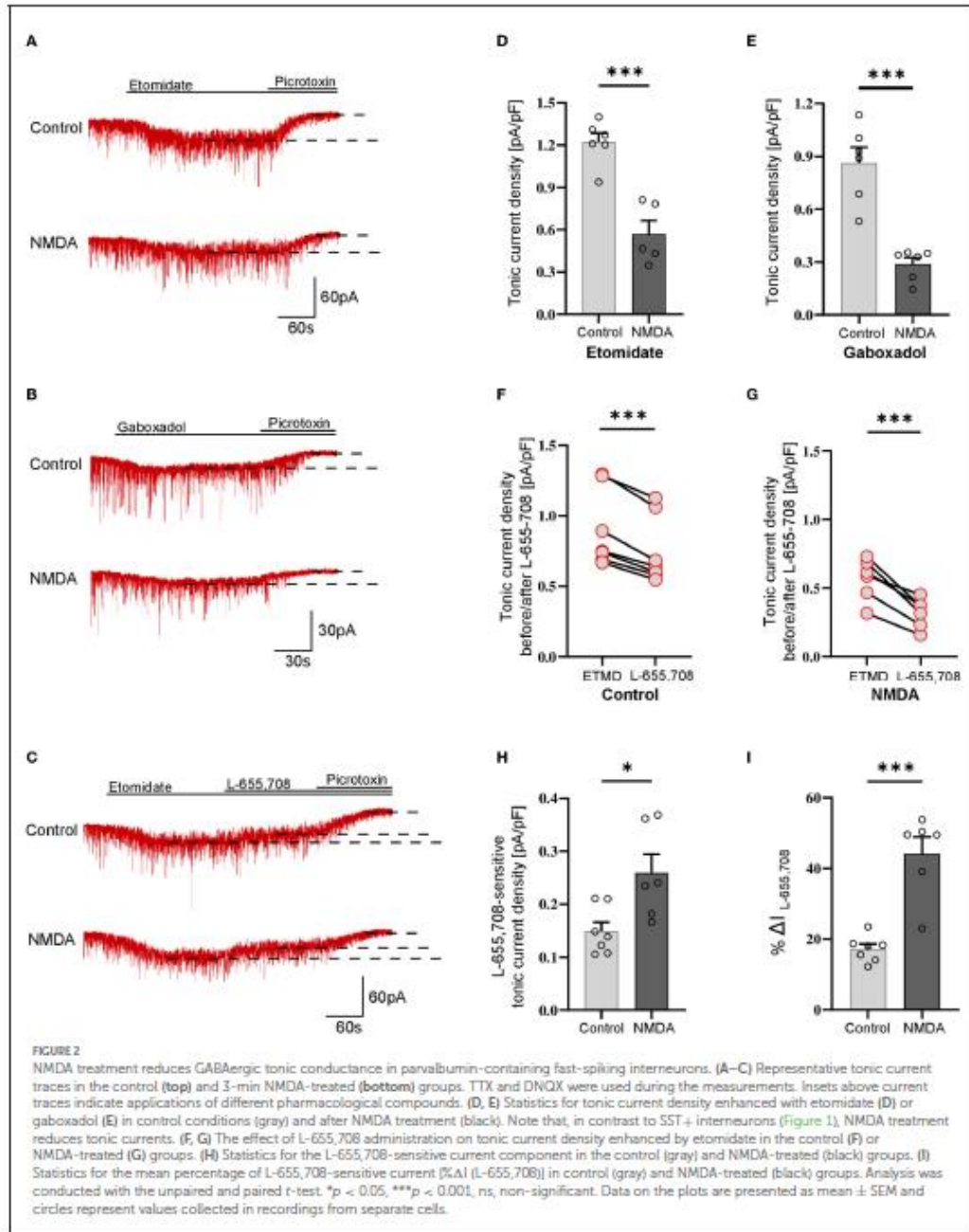
Taken together, we found that a brief NMDA treatment reduced tonic currents in both fast-spiking and non-fast-spiking PV-containing interneurons, and these changes were associated with the reduction of δ GABA_ARs content and increased proportion of $\alpha 5$ GABA_ARs in tonic current conductance.

4. Discussion

The most important finding of the present study is that tonic inhibition shows heterosynaptic, NMDAR-dependent, cell-specific plasticity in SST+ and PV+ interneurons. Importantly, these interneurons innervate distinct parts of pyramidal neurons exerting

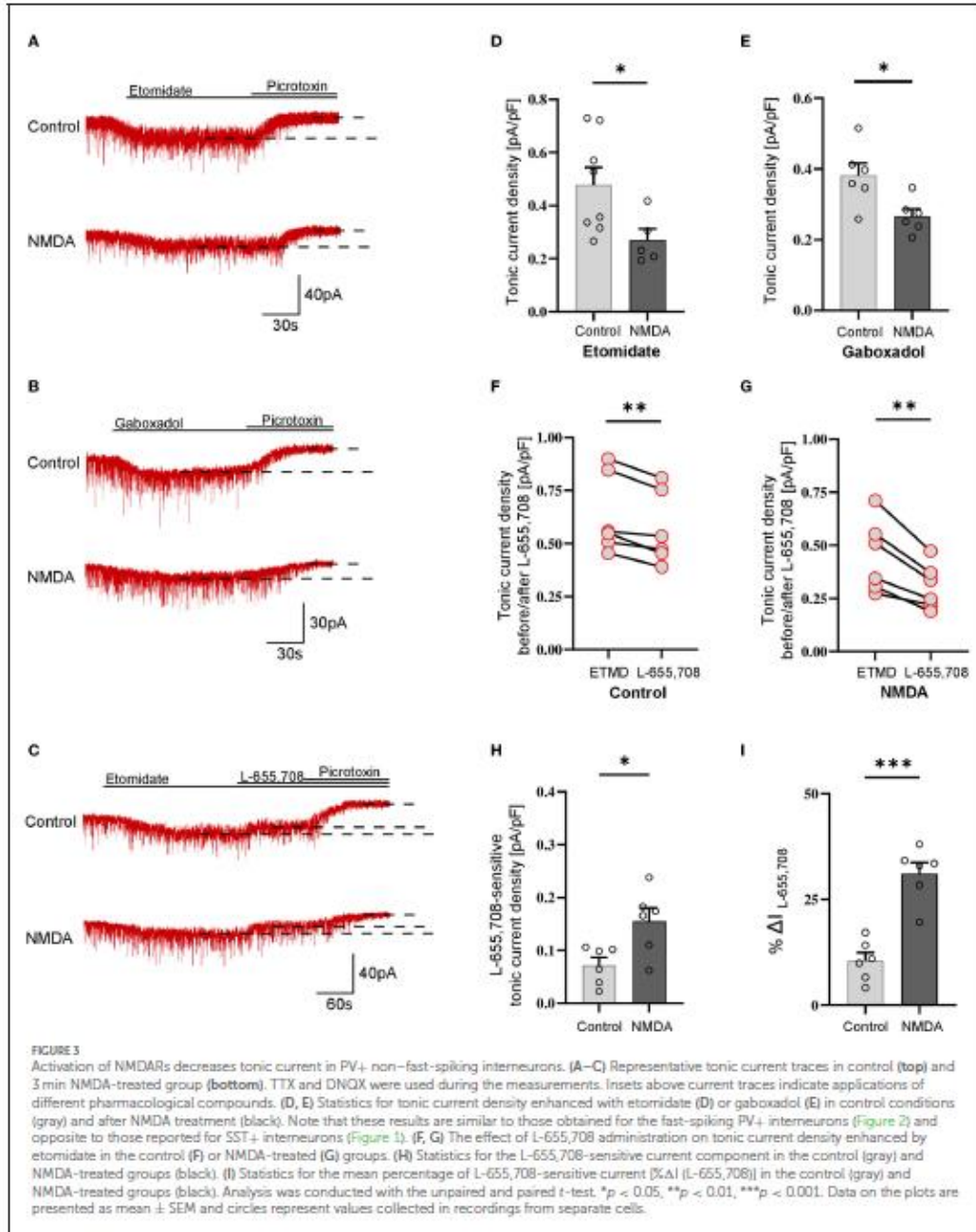
their unique regulatory roles in the principal neurons (Ognjanovski et al., 2017; Pelkey et al., 2017; Antonoudiou et al., 2020; Udakis et al., 2020). Most interestingly, the plastic phenomenon in these interneurons occurs in opposite directions: in SST+—enhancement and in the two types of PV+ cells—reduction of tonic conductance. Intriguingly, while fast-spiking and non-fast-spiking interneurons showed dramatically different patterns of excitability, their NMDAR-dependent plasticity of tonic conductance described here did not show any clear difference. Moreover, the regulation of tonic currents may depend on the contributions of δ - and $\alpha 5$ subunit-containing receptors. In the present study, NMDA-induced changes in the two types of interneurons were associated with different regulations of proportions of these receptor subtypes. Whereas, in the case of SST+ neurons, NMDA treatment did not affect the component of δ subunit-containing (gaboxadol-activated) but increased the $\alpha 5$ GABA_ARs content. In PV+ neurons, gaboxadol-sensitive current strongly decreased and the fraction of $\alpha 5$ GABA_ARs increased, which may be related to $\alpha 5$ GABA_ARs exocytosis. Since in the PV+ interneurons, the overall etomidate-enhanced tonic current was reduced upon NMDA treatment, our data suggest that the downregulation of tonically active δ subunit-containing GABA_ARs was predominant. However, we cannot exclude that observed tonic current could also include the contribution of other subtypes of GABA_ARs. It is also worth mentioning that, as described in Methods, we used a relatively low concentration of L-655,708 (20 nM) to avoid non-specific blockade of other GABA_AR subtypes. It is thus likely that the real proportion of $\alpha 5$ GABA_ARs in our model was higher than that indicated by the current drop upon L-655,708 administration. It is worth also noting that, due to a strong decrease in the overall tonic current upon NMDA treatment of PV+ cells (Figure 3D), a relatively small increase in $\alpha 5$ GABA_ARs content (Figure 3H) gave rise to a highly enhanced proportional contribution of these receptors [measured as % Δ I (L-655,708), Figure 3I], making the tonic inhibition substantially more dependent on $\alpha 5$ GABA_ARs than in control conditions.

In our previous report, we have confirmed that the tonic current component mediated by δ subunit-containing GABA_ARs in pyramidal neurons is small and that it is not undergoing plastic changes induced by NMDA application (Wyroślak et al., 2021). It is thus particularly interesting that, as we show in the present report, in the case of PV+ interneurons, the tonic conductance plasticity is strongly dependent on δ GABA_ARs. The relatively small tonic current recorded in pyramidal cells and enhanced by the administration of 1 μ M gaboxadol (~ 0.17 pA/pF; Wyroślak et al., 2021) contrasts with the several times larger tonic currents in PV+ fast-spiking interneurons measured under the same conditions (~ 0.86 pA/pF; Figure 2E). Moreover, PV+ non-fast spiking also exhibited greater δ GABA_AR-dependent tonic conduction (~ 0.38 pA/pF; Figure 3E). It is particularly interesting that δ GABA_AR-dependent tonic current in SST+ interneurons was comparable to the magnitude of tonic currents in pyramidal cells examined in the recent study (~ 0.18 pA/pF; Figure 1E). These findings appear to be mostly consistent with the results obtained by Lee and Maguire (2013), who reported that extrasynaptic, δ -subunit-containing GABA_ARs play a major role in mediating tonic GABAergic inhibition in hippocampal interneurons. Moreover,



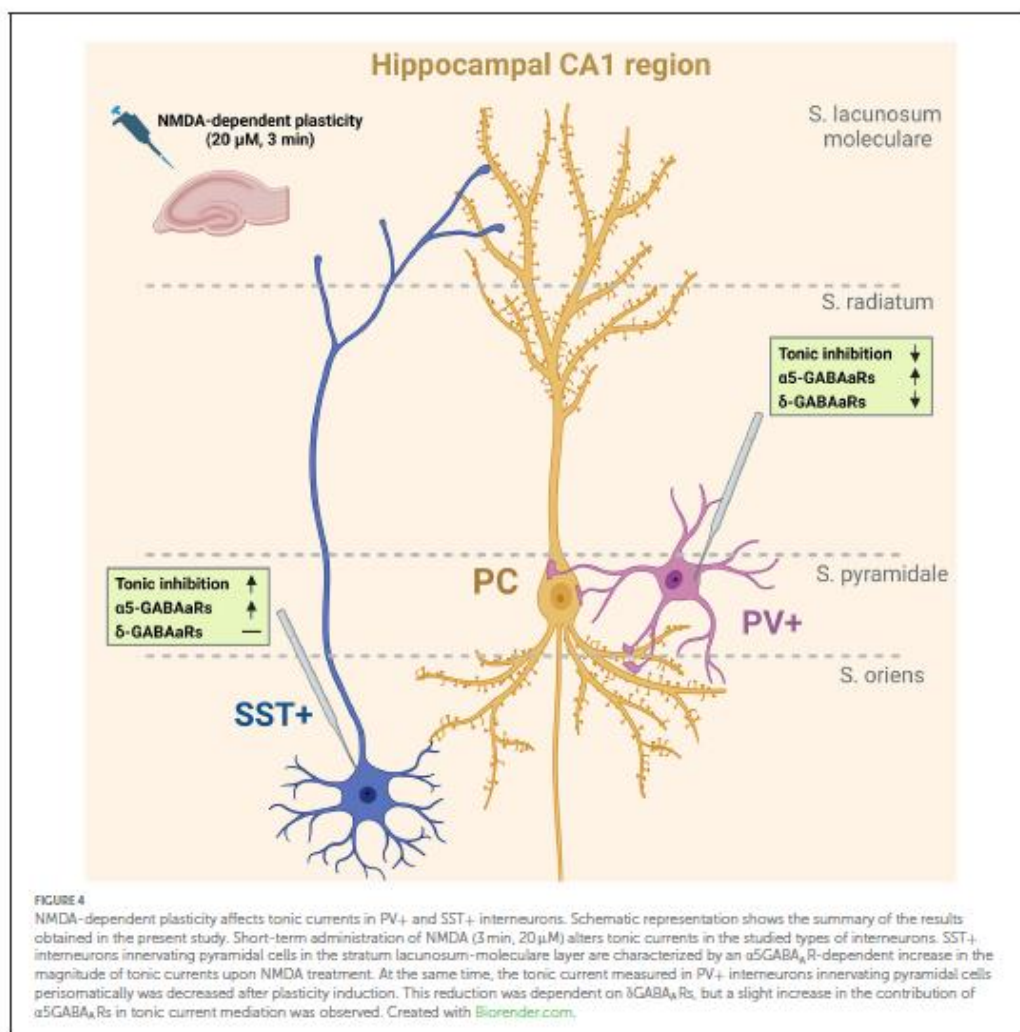
Lee and Maguire reported that the disinhibition of interneurons related to the inactivation of tonic currents resulted in substantial alterations in the neuronal excitability of pyramidal neurons and

decreased seizure susceptibility. It thus remains to be elucidated to what extent the plasticity of tonic currents reported here related to the altered contribution of δ GABA_ARs in PV+ interneurons



affects the network excitability and what its impact is on the cognitive and behavioral functions. While δ and $\alpha 5$ subunit-containing GABA_ARs are typically present to a larger or smaller

extent in different types of neurons, heterosynaptic NMDA-induced plasticity differentially affects these two components of tonic conductance. It is noteworthy that the component of



tonic current plasticity related to α 5GABA_ARs was present in all considered here interneurons (Figures 1–3) as well as in pyramidal 352 neurons (Wyroślak et al., 2021). These observations underscore the importance of the tonic current component mediated by α 5GABA_ARs which, most interestingly, was plastic in all these cells. However, in the case of PV+ interneurons, NMDA-induced plasticity resulted in an overall decrease in tonic current in spite of increased α 5GABA_AR content, indicating that, as already mentioned, its contribution in these cells was minor.

It is worth emphasizing that the role of α 5GABA_ARs in plastic phenomena is not limited to tonic conductance. A solid body of evidence showed that α 5GABA_ARs are implicated in GABAergic synapse function, participating in phasic inhibition and

thereby controlling postsynaptic excitability (Ali and Thomson, 2008; Zarnowska et al., 2009; Schulz et al., 2018; Magnin et al., 2019; Lodge et al., 2021). Indeed, in a recent study, Davenport et al. (2021) described an interesting form of plasticity in which α 5GABA_ARs from extrasynaptic zones were relocated into synapses due to the dissociation of these receptors from radixin upon its dephosphorylation. Moreover, Davenport reported that the blockade of α 5-GABA_ARs in the hippocampus accelerated reversal learning, a test for cognitive flexibility dependent on repeated LTP, providing further evidence that these receptors play a role in cognitive mechanisms. This mechanism has been, however, implicated in the pyramidal neurons, and it remains to be elucidated whether or not it takes place also in interneurons investigated in the present study. In our recent study

(Brzdak et al., 2023), we report that a brief treatment with NMDA evoked iLTP in SST+ and iLTD in PV+ interneurons. Thus, the effects on tonic conductance (present study) would thus sum up with analogous changes in phasic signaling in these neurons (Brzdak et al., 2023). As principal cells' spiking and network oscillations were regulated through feedforward and feedback inhibition from PV+ interneurons targeting perisomatic areas, a decrease of tonic inhibition in these interneurons may lead to a more effective inhibition of principal cells (see Figure 4). Thus, the overall synchronization of principal cells activity may be expected to increase (Pouille and Scanziani, 2001). Simultaneously, in the present report, we observed the upregulation of tonic inhibition in somatostatin-containing interneurons that target principal cells' dendrites in stratum lacunosum-moleculare, and this effect is accompanied by increased iLTP of mIPSCs (Brzdak et al., 2023). Considering that SST+ interneurons regulate local dendritic conductances and also excitatory synaptic plasticity, an increase in their tonic inhibition may result in less feedback inhibition onto principal cells (Chiu et al., 2013; Schulz et al., 2018). The opposite directions of synaptic (Brzdak et al., 2023) and primarily extrasynaptic tonic current plasticity of SST+ and PV+ were particularly interesting, considering the crucial impact of these interneurons on the local neuronal network and generation of theta rhythm (Sohal et al., 2009; Royer et al., 2012).

Plastic changes induced by the NMDAR activity may depend on the subtype of these receptors. A recent study, using GluN2A-null rats, has indicated that GluN2A is a major NMDAR subunit in SST+ INs, only partially contributing to NMDA-EPSCs in PV+ cells (Booker et al., 2021). Wu et al. (2021) addressed the involvement of GluN2A- and GluN2B-NMDARs in tonic current regulation in hippocampal neuronal culture and found that GluN2A inhibits and GluN2B promotes α 5GABA_AR internalization, thus providing evidence for the distinct involvement of these NMDA-subunits in regulating tonic inhibitory plasticity. We cannot exclude the possibility that the NMDA-induced increase in tonic current in SST+ INs could involve GluN2A-dependent α 5GABA_AR internalization, but this issue would require further studies.

The emerging mechanisms of tonic conductance regulation in different neuronal types by plasticity phenomena related to the components mediated by δ - and α 5-GABA_AR appear particularly interesting in the light of growing evidence that, with genetic or pharmacological manipulations, these receptors affect learning and memory formation (Collinson et al., 2002; Saab et al., 2010; Zurek et al., 2012; Whissell et al., 2013b; Cushman et al., 2014; Mohler and Rudolph, 2017). As already mentioned, SST+ and PV+ interneurons are known to play a key role in shaping local circuit excitability as well as in learning and memory and brain pathology (Donato et al., 2013; Caroni, 2015; Ognjanovski et al., 2017; Mikulovic et al., 2018; Tripodi et al., 2018; Donegan et al., 2019; Serrano and Caroni, 2019; Udakis et al., 2020; Asgarihafshejani et al., 2022; Liguz-lecznar et al., 2022), but it remains to be elucidated to what extent the plasticity of tonic conductance at specific interneurons is involved in these functional and cognitive roles.

In conclusion, we present the first evidence that tonic inhibition is a plastic component of GABAergic drive in hippocampal SST+ and PV+ interneurons and have demonstrated that the underlying mechanisms depend on different GABA_AR subtypes and are cell-type specific.

Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Ethics statement

All experiments were carried out in accordance with the Polish Animal Protection Act (Act of 15 January 2015, changed 17 November 2021; directive 2010/63/EU). The animal study was reviewed and approved by Komisja Bioetyczna przy Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk.

Author contributions

MW conducted experiments, carried out data analysis, and contributed to writing and editing the manuscript. GD provided methodological support and participated in editing the manuscript. JM conceived and supervised the project, procured financial support, participated in designing the experiments, and wrote and edited the final version of the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

The research was supported by the National Science Center (NCN) grant UMO-2018/31/B/NZ4/01998.

Acknowledgments

The authors are grateful to Grzegorz Wiera for helpful discussions and proofreading the article.

Conflict of interest

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

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

References

- Alt, A. B., and Thomson, A. M. (2008). Synaptic $\alpha 5$ subunit-containing GABAA receptors mediate IPSPs elicited by dendrite-preferring cells in rat neocortex. *Cereb. Cortex* 18, 1260–1271. doi: 10.1093/cercor/bhm160
- Antonoudou, P., Tan, Y. L., Kontou, G., Louise Upton, A., and Mann, E. O. (2020). Parvalbumin and somatostatin interneurons contribute to the generation of hippocampal gamma oscillations. *J. Neurosci.* 40, 7668–7687. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0261-20.2020
- Asgarihafeji, A., Honoré, E., Michon, F. X., Laplante, L., and Lacaille, J. C. (2022). Long-term potentiation at pyramidal cell to somatostatin interneuron synapses controls hippocampal network plasticity and memory. *iScience* 25, 104259. doi: 10.1016/j.isci.2022.104458
- Atack, J. R., Bayley, P. J., Seashook, G. R., Walford, K. A., McKernan, R. M., and Dawson, G. R. (2006). L-655,708 enhances cognition in rats but is not proconvulsant at a dose selective for $\alpha 5$ -containing GABAA receptors. *Neuropharmacology* 51, 1023–1029. doi: 10.1016/j.neuropharm.2006.04.018
- Ballard, T. M., Knöflach, F., Prinsen, E., Borroni, E., Vivian, J. A., Bastle, J., et al. (2009). RO4938581, a novel cognitive enhancer acting at GABAA $\alpha 5$ subunit-containing receptors. *Psychopharmacology* 202, 207–223. doi: 10.1007/s00213-008-1357-7
- Booker, S. A., Sumera, A., Kind, P. C., and Wyllie, D. J. A. (2021). Contribution of nmda receptors to synaptic function in rat hippocampal interneurons. *eNeuro* 8, ENEURO.0552-20.2021. doi: 10.1523/ENEURO.0552-20.2021
- Brickley, S. G., Cull-Candy, S. G., and Farrant, M. (1996). Development of a tonic form of synaptic inhibition in rat cerebellar granule cells resulting from persistent activation of GABAA receptors. *J. Physiol.* 497, 753–759. doi: 10.1113/jphysiol.1996.sp021806
- Brickley, S. G., and Mody, I. (2012). Extrasynaptic GABA A receptors: their function in the CNS and implications for disease. *Neuron* 73, 23–34. doi: 10.1016/j.neuron.2011.12.012
- Bright, D. P., and Smart, T. G. (2013). Methods for recording and measuring tonic GABAA receptor-mediated inhibition. *Front. Neural Circuits* 7, 1–13. doi: 10.3389/fncir.2013.00193
- Bradak, P., Lebida, K., Wyroślak, M., and Mozrzymas, J. W. (2023). GABAergic synapses onto SST and PV interneurons in the CA1 hippocampal region show cell-specific and integrin-dependent plasticity. *Sci. Rep.* 13, 5079. doi: 10.1038/s41598-023-31882-4
- Carascos, V. B., Elliott, E. M., You-Ten, K. E., Cheng, V. Y., Belelli, D., Newell, J. G., et al. (2004). Tonic inhibition in mouse hippocampal CA1 pyramidal neurons is mediated by $\alpha 5$ subunit-containing γ -aminobutyric acid type A receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 3662–3667. doi: 10.1073/pnas.0307231101
- Caroni, P. (2015). Regulation of Parvalbumin Basket cell plasticity in rule learning. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 460, 100–103. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.023
- Cheng, V. Y., Martin, L. J., Elliott, E. M., Kim, J. H., Mouni, H. T. J., Taverna, F. A., et al. (2006). $\alpha 5$ GABAA receptors mediate the amnestic but not sedative-hypnotic effects of the general anesthetic etomidate. *J. Neurosci.* 26, 3713–3720. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5024-05.2006
- Chiu, C. Q., Lur, G., Morse, T. M., Carnevale, N. T., Ellis-Davies, G. C. R., and Hgley, M. J. (2013). Compartmentalization of GABAergic inhibition by dendritic spines. *Science* 340, 759–762. doi: 10.1126/science.1234274
- Chiu, C. Q., Mariemson, J. S., Yamazaki, M., Natsume, R., Sakimura, K., Tomita, S., et al. (2018). Input-Specific NMDAR-Dependent Potentiation of Dendritic GABAergic Inhibition. *Neuron* 97, 368–377.e3. doi: 10.1016/j.neuron.2017.12.032
- Collinson, N., Kuenzi, F. M., Jarolimek, W., Maubach, K. A., Cothliff, R., Sur, C., et al. (2002). Enhanced learning and memory and altered GABAergic synaptic transmission in mice lacking the $\alpha 5$ subunit of the GABAA receptor. *J. Neurosci.* 22, 5572–5580. doi: 10.1523/JNEUROSCI.122-13-05572.2002
- Cushnan, J. D., Moore, M. D., Olsen, R. W., and Fanselow, M. S. (2014). The role of the β GABA(A) receptor in ovarian cycle-linked changes in hippocampus-dependent learning and memory. *Neurochem. Res.* 39, 1140–1146. doi: 10.1007/s11064-014-1282-6
- Davenport, C. M., Rajappa, R., Katchan, L., Taylor, C. R., Tsai, M. C., Smith, C. M., et al. (2021). Relocation of an extrasynaptic GABAA receptor to inhibitory synapses freezes excitatory synaptic strength and preserves memory. *Neuron* 109, 123–134.e4. doi: 10.1016/j.neuron.2020.09.037
- Donato, F., Rompani, S. B., and Caroni, P. (2013). Parvalbumin-expressing basket-cell network plasticity induced by experience regulates adult learning. *Nature* 504, 272–276. doi: 10.1038/nature12866
- Donegan, J. J., Boley, A. M., Yamaguchi, J., Toney, G. M., and Lodge, D. J. (2019). Modulation of extrasynaptic GABAA $\alpha 5$ receptors in the ventral hippocampus normalizes physiological and behavioral deficits in a circuit specific manner. *Nat. Commun.* 10, 1–12. doi: 10.1038/s41467-019-10800-1
- Farrant, M., and Nusser, Z. (2005). Variations on an inhibitory theme: Phasic and tonic activation of GABA A receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 215–229. doi: 10.1038/nrn1625
- Field, M., Lukacs, I. P., Hunter, E., Stacey, R., Flaha, P., Livermore, L., et al. (2021). Tonic GABAA receptor-mediated currents of human cortical GABAergic interneurons vary amongst cell types. *J. Neurosci.* 41, 9702–9719. doi: 10.1523/JNEUROSCI.10175-21.2021
- Glykys, J., Mann, E. O., and Mody, I. (2008). Which GABAA receptor subunits are necessary for tonic inhibition in the hippocampus? *J. Neurosci.* 28, 1421–1426. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4751-07.2008
- Glykys, J., and Mody, I. (2007). The main source of ambient GABA responsible for tonic inhibition in the mouse hippocampus. *J. Physiol.* 582, 1163–1178. doi: 10.1113/jphysiol.2007.134460
- Honoré, E., Khlafia, A., Bosson, A., and Lacaille, J. C. (2021). Hippocampal somatostatin interneurons, long-term synaptic plasticity and memory. *Front. Neural Circ.* 15, 1–24. doi: 10.3389/fncir.2021.687558
- Kaneda, M., Farrant, M., and Cull-Candy, S. G. (1995). Whole-cell and single-channel currents activated by GABA and glycine in granule cells of the rat cerebellum. *J. Physiol.* 485, 419–435. doi: 10.1113/jphysiol.1995.sp020739
- Leko, R. N., Mtkulovic, S., Leko, K. E., Munguba, H., Gezelius, H., Enjtt, A., et al. (2012). OLM interneurons differentially modulate CA3 and entorhinal inputs to hippocampal CA1 neurons. *Nat. Neurosci.* 15, 1524–1530. doi: 10.1038/nn.3235
- Lebida, K., and Mozrzymas, J. W. (2017). Spike timing-dependent plasticity in the mouse barrel cortex is strongly modulated by sensory learning and depends on activity of matrix metalloproteinase 9. *Mol. Neurobiol.* 54, 6723–6736. doi: 10.1007/s12035-016-0174-y
- Lee, V., and Maguire, J. (2013). Impact of inhibitory constraint of interneurons on neuronal excitability. *J. Neurophysiol.* 110, 2520–2535. doi: 10.1152/jn.00047.2013
- Lerma, J., Herranz, A. S., Herreras, O., Abaira, V., and del Río, R. M. (1986). In vivo determination of extracellular concentration of amino acids in the rat hippocampus. A method based on brain dialysis and computerized analysis. *Brain Res.* 384, 145–155. doi: 10.1016/0006-8993(86)91230-8
- Liguz-leczmar, M., Dobrzanski, G., and Kossut, M. (2022). Somatostatin and somatostatin-containing interneurons — from plasticity to pathology. *Biomolecules* 12, 312. doi: 10.3390/biom12020312
- Lodge, M., Hernandez, M. C., Schulz, J. M., and Bitschberger, J. (2021). Sparsification of AP firing in adult-born hippocampal granule cells via voltage-dependent $\alpha 5$ -GABAA receptors. *Cell Rep.* 37, 109768. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109768
- Maguin, E., Francavilla, R., Amalyan, S., Gervats, E., David, L. S., Luo, X., et al. (2019). Input-specific synaptic location and function of the $\alpha 5$ GABA A receptor subunit in the mouse CA1 hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 39, 788–801. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1067-18.2018
- Mangan, P. S., Sun, C., Carpenter, M., Goodkin, H. P., Steghart, W., and Kapur, J. (2005). Cultured hippocampal pyramidal neurons express two kinds of GABA A receptors. *Mol. Pharmacol.* 67, 775–788. doi: 10.1124/mol.104.007385
- Marsden, K. C., Beattie, J. B., Friedenthal, J., and Carroll, R. C. (2007). NMDA receptor activation potentiates inhibitory transmission through GABA receptor-associated protein-dependent exocytosis of GABAA receptors. *J. Neurosci.* 27, 14326–14337. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4433-07.2007
- Martin, L. J., Oh, G. H. T., and Orser, B. A. (2009). Etomidate targets $\alpha 5$ γ -aminobutyric acid subtype A receptors to regulate synaptic plasticity and memory blockade. *Anesthesiology* 111, 1025–1035. doi: 10.1097/ALN.0b013e3181bbc961
- Martin, L. J., Zurek, A. A., MacDonald, J. F., Roder, J. C., Jackson, M. F., and Orser, B. A. (2010). $\alpha 5$ GABAA receptor activity sets the threshold for long-term potentiation and constrains hippocampus-dependent memory. *J. Neurosci.* 30, 5269–5282. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4209-09.2010
- Mtkulovic, S., Restrepo, C. E., Swami, S., Bauer, P., Pupe, S., Tort, A. B. L., et al. (2018). Ventral hippocampal OLM cells control type 2 theta oscillations and response to predator odor. *Nat. Commun.* 9, 3638. doi: 10.1038/s41467-018-05907-w
- Mody, I., Glykys, J., and Wet, W. (2007). A new meaning for “Gm & Tonic”: tonic inhibition as the target for ethanol action in the brain. *Alcohol* 41, 145–153. doi: 10.1016/j.alcohol.2007.03.009
- Möhler, H., and Rudolph, U. (2017). Disinhibition, an emerging pharmacology of learning and memory. *Front. Behav. Neurosci.* 6, 1–10. doi: 10.12688/fnbeh.2017.00001
- Ognjanovsk, N., Schaeffer, S., Wu, J., Mofakham, S., Maruyama, D., Zochowski, M., et al. (2017). Parvalbumin-expressing interneurons coordinate hippocampal network dynamics required for memory consolidation. *Nat. Commun.* 8, 15039. doi: 10.1038/ncomms15039

- Felkey, K. A., Chittajallu, R., Craig, M. T., Tricote, L., Wester, J. C., and McClain, C. J. (2017). Hippocampal GABAergic inhibitory interneurons. *Physiol. Rev.* 97, 1619–1747. doi: 10.1152/physrev.00807.2017
- Pouille, F., and Scanziani, M. (2001). Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science* 293, 1159–1163. doi: 10.1126/science.1060342
- Rodgers, F. C., Zarnowska, E. D., Laha, K. T., Engin, E., Zeller, A., Keist, R., et al. (2015). Etomidate impairs long-term potentiation in vitro by targeting $\alpha 5$ -subunit containing GABA_A receptors on nonpyramidal cells. *J. Neurosci.* 35, 9707–9716. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0315-15.2015
- Royer, S., Zemelman, B. V., Losonczy, A., Kim, J., Chance, F., Magee, J. C., et al. (2012). Control of timing, rate and bursts of hippocampal place cells by dendritic and somatic inhibition. *Nat. Neurosci.* 15, 769–775. doi: 10.1038/nn.3077
- Saah, B. J., MacLean, A. J. B., Kantsek, M., Zurek, A. A., Martin, L. J., Roder, J. C., et al. (2010). Short-term memory impairment after isoflurane in mice is prevented by the $\alpha 5$ γ -aminobutyric acid type A receptor inverse agonist L-655,708. *Anesthesiology* 113, 1061–1071. doi: 10.1097/ALN.0b013e3181f56228
- Schulz, J. M., Knoflach, F., Hernandez, M. C., and Bischofberger, J. (2018). Dendrite-targeting interneurons control synaptic NMDA-receptor activation via nonlinear $\alpha 5$ -GABA_A receptors. *Nat. Commun.* 9, 3576. doi: 10.1038/s41467-018-06004-8
- Serrano, M., and Caroni, P. (2019). Managing neuronal ensembles: somatostatin interneuron subpopulations shape and protect cortical neuronal ensembles for learning. *Neuron* 102, 6–8. doi: 10.1016/j.neuron.2019.03.016
- Serwanski, D. R., Miralles, C. P., Christie, S. B., Mehta, A. K., Li, X., and De Blas, A. L. (2006). Synaptic and nonsynaptic localization of GABA_A receptors containing the $\alpha 5$ subunit in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 499, 458–470. doi: 10.1002/cne.21115
- Sohal, V. S., Zhang, F., Yizhar, O., and Deisseroth, K. (2009). Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature* 459, 698–702. doi: 10.1038/nature07991
- Song, C., Ehlers, V. L., and Moyer, J. R. (2015). Trace fear conditioning differentially modulates intrinsic excitability of medial prefrontal cortex-basolateral complex of amygdala projection neurons in infralimbic and prelimbic cortices. *J. Neurosci.* 35, 13511–13524. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2329-15.2015
- Sun, C., Sieghart, W., and Kapur, J. (2004). Distribution of $\alpha 1$, $\alpha 4$, $\gamma 2$, and δ subunits of GABA_A receptors in hippocampal granule cells. *Brain Res.* 1029, 207–216. doi: 10.1016/j.brainres.2004.09.056
- Tripodi, M., Bhandari, K., Chowdhury, A., Mukherjee, A., and Caroni, P. (2018). Parvalbumin interneuron plasticity for consolidation of reinforced learning. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 83, 25–35. doi: 10.1101/sqb.2018.83.037630
- Udakis, M., Pedrosa, V., Chamberlain, S. E. L., Clopath, C., and Mellor, J. R. (2020). Interneuron-specific plasticity at parvalbumin and somatostatin inhibitory synapses onto CA1 pyramidal neurons shapes hippocampal output. *Nat. Commun.* 11, 4395. doi: 10.1038/s41467-020-18074-8
- Urban-Clecko, J., Kossut, M., and Mozrzymas, J. W. (2010). Sensory learning differentially affects GABAergic tonic currents in excitatory neurons and fast spiking interneurons in layer 4 of mouse barrel cortex. *J. Neurophysiol.* 104, 746–754. doi: 10.1152/jn.00988.2009
- Vargas-Caballero, M., Martin, L. J., Saller, M. W., Orser, B. A., and Paulsen, O. (2010). $\alpha 5$ Subunit-containing GABA_A receptors mediate a slowly decaying inhibitory synaptic current in CA1 pyramidal neurons following Schaffer collateral activation. *Neuropharmacology* 58, 668–675. doi: 10.1016/j.neuropharm.2009.11.005
- Whitwell, P. D., Eng, D., Lecker, I., Martin, L. J., Wang, D. S., and Orser, B. A. (2013a). Acutely increasing δ GABA_A receptor activity impairs memory and inhibits synaptic plasticity in the hippocampus. *Front. Neural Circ.* 7, 1–12. doi: 10.3389/fncir.2013.00146
- Whitwell, P. D., Rosenzweig, S., Lecker, I., Wang, D. S., Wojtowicz, J. M., and Orser, B. A. (2013b). γ -aminobutyric acid type A receptors that contain the δ subunit promote memory and neurogenesis in the dentate gyrus. *Ann. Neurol.* 74, 611–621. doi: 10.1002/ana.23941
- Wiera, G., Brzdak, P., Lech, A. M., Lebida, K., Jabońska, J., Gmerek, P., et al. (2022). Integrins bidirectionally regulate the efficacy of inhibitory synaptic transmission and control GABAergic plasticity. *J. Neurosci.* 42, 1–13. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1458-21.2022
- Wiera, G., Lebida, K., Lech, A. M., Brzdak, P., Van Hove, I., De Groef, L., et al. (2021). Long-term plasticity of inhibitory synapses in the hippocampus and spatial learning depends on matrix metalloproteinase 3. *Cell. Mol. Life Sci.* 78, 2279–2298. doi: 10.1007/s00018-020-03640-6
- Wu, K., Castellano, D., Tian, Q., and Lu, W. (2021). Distinct regulation of tonic GABAergic inhibition by NMDA receptor subtypes. *Cell Rep.* 37, 109960. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109960
- Wyroślak, M., Lebida, K., and Mozrzymas, J. W. (2021). Induction of inhibitory synaptic plasticity enhances tonic current by increasing the content of $\alpha 5$ -subunit containing GABA_A receptors in hippocampal pyramidal neurons. *Neuroscience* 467, 39–46. doi: 10.1016/j.neuroscience.2021.05.020
- Zamowka, E. D., Keist, R., Rudolph, U., and Pearce, R. A. (2009). GABA_A receptor $\alpha 5$ subunits contribute to GABA_A slow synaptic inhibition in mouse hippocampus. *J. Neurophysiol.* 101, 1179–1191. doi: 10.1152/jn.91203.2008
- Zamowka, E. D., Rodgers, F. C., Oh, I., Rau, V., Lor, C., Laha, K. T., et al. (2015). Etomidate blocks LTP and impairs learning but does not enhance tonic inhibition in mice carrying the N265M point mutation in the beta3 subunit of the GABA_A receptor. *Neuropharmacology* 93, 171–178. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.01.011
- Zurek, A. A., Bridgewater, E. M., and Orser, B. A. (2012). Inhibition of $\alpha 5$ γ -aminobutyric acid type A receptors restores recognition memory after general anesthesia. *Anesth. Analg.* 114, 845–855. doi: 10.1213/ANE.0b013e31824720da

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Mózg posiada zdolność do zmian w tkance nerwowej, zwanej neuroplastycznością, która jest kluczowa dla jego prawidłowego funkcjonowania. W ostatnich latach wielu naukowców skupia się na badaniach transmisji hamującej, zwłaszcza jej plastycznego komponentu. Transmisja GABAergiczna, która jest rodzajem hamującej transmisji, odgrywa istotną rolę w utrzymaniu równowagi pomiędzy transmisją pobudzającą a hamującą, wpływając na procesy poznawcze, takie jak uczenie się i tworzenie pamięci. Istnieją dwie główne składowe tej transmisji: transmisja fazowa, która zachodzi w synapsach za pośrednictwem receptorów GABA_A oraz transmisja toniczna, która zależy od receptorów zlokalizowanych poza synapsami. W hipokampie, prądy toniczne są mediowane przez receptory GABA_A o różnym składzie podjednostkowym, przy czym receptory zawierające podjednostkę $\alpha 5$ lub δ są uważane za kluczowe w tym procesie. Badania wskazują, że receptory GABA_A poza synapsami odgrywają istotną rolę w uczeniu się i tworzeniu pamięci zależnej od hipokampa.

Niniejsza rozprawa doktorska miała na celu sprawdzenie czy transmisja toniczna, podobnie jak synaptyczna, podlega zmianom plastycznym. W ramach realizacji tego celu wykorzystano model plastyczności transmisji GABAergicznej zależnej od receptorów NMDA, myszy transgeniczne oraz myszy typu dzikiego, aby opisać zmiany plastyczne w transmisji tonicznej zależne od typu komórki. Odkryto, że GABAergiczny prąd toniczny nie tylko podlega procesom plastycznym, ale również, że obserwowana plastyczność jest zależna od typu komórki.

Zgodnie z założeniami pracy doktorskiej, w pierwszej kolejności zajęto się wpływem indukcji plastyczności na ekstrasynaptyczne prądy toniczne w komórkach piramidowych regionu CA1 hipokampa myszy. Odkryto, że plastyczność zależna od receptorów NMDA wiąże się ze znacznym wzrostem prądu tonu GABAergicznego w komórkach piramidowych hipokampa. Ten efekt był związany z większym udziałem receptorów GABA_A zawierających podjednostkę $\alpha 5$, podczas gdy pula receptorów z podjednostką δ nie uległa zmianie. Inne badania wskazują na fakt, że podczas indukcji plastyczności transmisji hamującej receptory $\alpha 5$ GABA_A migrują do synaps hamujących, wzmacniając ich potencjał. Badania prezentowane w ramach niniejszej doktorskiej wskazują, że ekstrasynaptyczna pula receptorów $\alpha 5$ GABA_A, które w przypadku komórek

piramidowych odpowiadają za zdecydowaną większość mediowanego prądu tonicznego, zwiększa się, co prawdopodobnie wynika z egzocytozy receptorów.

Drugim zagadnieniem poruszonym w niniejszej pracy doktorskiej było zbadanie efektów indukcji plastyczności w różnych typach interneuronów hipokampa. Dzięki zastosowaniu specyficznej farmakologii udało się wykazać, że prądy toniczne w interneuronach w dużym stopniu podlegają zależnym od typu komórki procesom plastycznym. Interneurony somatostatynowe, które unerwiają dendryty komórek piramidowych w stratum lacunosum-moleculare, charakteryzowały się, podobnym do komórek piramidowych, kierunkiem zmian plastycznych. Krótkotrwałe podanie NMDA skutkowało wzmocnieniem GABAergicznego prądu tonicznego w interneuronach SST+, a wynikało to ze zwiększenia puli receptorów $\alpha 5$ GABA_A. Co interesujące, pula receptorów δ GABA_A nie została naruszona, mimo faktu, że to δ GABA_A są odpowiedzialne za mediowanie większości transmisji tonicznej w interneuronach. Jednocześnie, ten sam protokół indukcji plastyczności wywołał zmniejszenie prądów tonicznych w interneuronach parwalbuminowych (PV+). Wykazano, że ten spadek wynikał ze zmniejszenia puli receptorów δ GABA_A. W związku z faktem, że receptorów δ GABA_A zaangażowanych w mediowany prąd toniczny było mniej, zaobserwowano również zwiększenie udziału receptorów GABA_A z podjednostką $\alpha 5$.

Wyniki te wskazują, że plastyczność transmisji tonicznej jest nowym aspektem neuroplastyczności, a jej mechanizmy zależą od typu neuronu oraz równowagi pomiędzy receptorami GABA_A zawierającymi podjednostki $\alpha 5$ i δ . Dodatkowo, aspekty dotyczące wpływu indukcji plastyczności oraz aktywności integryn na transmisję GABAergiczną w hipokampie omówione zostały w publikacji niewchodzącej w skład tej pracy doktorskiej. W wymienionej pracy pokazujemy krótkotrwałe podanie NMDA wywołuje wzmocnienie transmisji hamującej (iLTP) w interneuronach SST+ oraz jej osłabienie w interneuronach PV+. W rezultacie, obserwujemy sumowanie się analogicznych zmian w sygnalizacji fazowej oraz tonicznej w badanych typach komórek nerwowych. W hipokampie, interneurony PV+ unerwiają głównie ciała komórkowe komórek piramidowych, a ze względu na swoją hamującą naturę, obserwacja zmniejszenia hamowania w tych komórkach może prowadzić do bardziej skutecznego hamowania komórek piramidowych. Z kolei interneurony SST+ regulują przewodnictwo dendrytyczne poprzez tworzenie wypustek w oddaleniu od ciała komórkowego komórek piramidowych. Obserwując wzmożenie prądu tonicznego po indukcji plastyczności w interneuronach zawierających

somatostatynę, bardzo prawdopodobną wydaje się być hipoteza o zmniejszeniu hamowania zwrotnego na komórkach piramidowych.

Podsumowując, badania przedstawione w ramach niniejszej pracy doktorskiej, wskazują na kluczową rolę ekstrasynaptycznych receptorów GABA_A w modulacji transmisji hamującej i wpływie na funkcjonowanie sieci neuronalnych. Wyniki uzyskano w oparciu o szeroko zakrojone badania elektrofizjologiczne z wykorzystaniem specyficznej wobec konkretnych typów receptora GABA_A farmakologii. Uzyskana wiedza może być wykorzystana podczas kolejnych prób zrozumienia molekularnych podstaw funkcjonowania sieci neuronalnych, prowadząc tym samym do zrozumienia działania układu nerwowego.

BIBLIOGRAFIA

- Abraham, W. C., Jones, O. D., and Glanzman, D. L. (2019). Is plasticity of synapses the mechanism of long-term memory storage? *npj Sci. Learn.* 4. doi: 10.1038/s41539-019-0048-y.
- Andres, A. L., Regev, L., Phi, L., Seese, R. R., Chen, Y., Gall, C. M., et al. (2013). NMDA receptor activation and calpain contribute to disruption of dendritic spines by the stress neuropeptide CRH. *J. Neurosci.* 33, 16945–16960. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1445-13.2013.
- Ballard, T. M., Knoflach, F., Prinssen, E., Borroni, E., Vivian, J. A., Basile, J., et al. (2009). RO4938581, a novel cognitive enhancer acting at GABAA $\alpha 5$ subunit-containing receptors. *Psychopharmacology (Berl)*. 202, 207–223. doi: 10.1007/s00213-008-1357-7.
- Bannai, H., Lévi, S., Schweizer, C., Inoue, T., Launey, T., Racine, V., et al. (2009). Activity-Dependent Tuning of Inhibitory Neurotransmission Based on GABAAR Diffusion Dynamics. *Neuron* 62, 670–682. doi: 10.1016/j.neuron.2009.04.023.
- Barberis, A. (2020). Postsynaptic plasticity of GABAergic synapses. *Neuropharmacology* 169, 107643. doi: 10.1016/j.neuropharm.2019.05.020.
- Booker, S. A., and Vida, I. (2018). Morphological diversity and connectivity of hippocampal interneurons. *Cell Tissue Res.* 373, 619–641. doi: 10.1007/s00441-018-2882-2.
- Briz, V., and Baudry, M. (2017). Calpains: Master Regulators of Synaptic Plasticity. *Neuroscientist* 23, 221–231. doi: 10.1177/1073858416649178.
- Brzdąk, P., Lebida, K., Wyroślak, M., and Mozrzymas, J. W. (2023). GABAergic synapses onto SST and PV interneurons in the CA1 hippocampal region show cell-specific and integrin-dependent plasticity. *Sci. Rep.* 13, 5079. doi: 10.1038/s41598-023-31882-4.
- Caraiscos, V. B., Elliott, E. M., You-Ten, K. E., Cheng, V. Y., Belelli, D., Newell, J. G., et al. (2004). Tonic inhibition in mouse hippocampal CA1 pyramidal neurons is mediated by $\alpha 5$ subunit-containing γ -aminobutyric acid type A receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 3662–3667. doi: 10.1073/pnas.0307231101.

- Chen, X., Keramidas, A., and Lynch, J. W. (2017). Physiological and pharmacological properties of inhibitory postsynaptic currents mediated by $\alpha 5\beta 1\gamma 2$, $\alpha 5\beta 2\gamma 2$ and $\alpha 5\beta 3\gamma 2$ GABAA receptors. *Neuropharmacology* 125, 243–253. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.07.027.
- Chiu, C. Q., Barberis, A., and Higley, M. J. (2019). Preserving the balance: diverse forms of long-term GABAergic synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 20, 272–281. doi: 10.1038/s41583-019-0141-5.
- Chiu, C. Q., Martenson, J. S., Yamazaki, M., Natsume, R., Sakimura, K., Tomita, S., et al. (2018). Input-Specific NMDAR-Dependent Potentiation of Dendritic GABAergic Inhibition. *Neuron* 97, 368-377.e3. doi: 10.1016/j.neuron.2017.12.032.
- Choquet, D., and Triller, A. (2013). The dynamic synapse. *Neuron* 80, 691–703. doi: 10.1016/j.neuron.2013.10.013.
- Collinson, N., Kuenzi, F. M., Jarolimek, W., Maubach, K. A., Cothliff, R., Sur, C., et al. (2002). Enhanced learning and memory and altered GABAergic synaptic transmission in mice lacking the $\alpha 5$ subunit of the GABAA receptor. *J. Neurosci.* 22, 5572–5580. doi: 10.1523/jneurosci.22-13-05572.2002.
- Costa, J. T., Mele, M., Baptista, M. S., Gomes, J. R., Ruscher, K., Nobre, R. J., et al. (2016). Gephyrin Cleavage in In Vitro Brain Ischemia Decreases GABAA Receptor Clustering and Contributes to Neuronal Death. *Mol. Neurobiol.* 53, 3513–3527. doi: 10.1007/s12035-015-9283-2.
- Crestani, F., Keist, R., Fritschy, J. M., Benke, D., Vogt, K., Prut, L., et al. (2002). Trace fear conditioning involves hippocampal $\alpha 5$ GABAA receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 8980–8985. doi: 10.1073/pnas.142288699.
- Cushman, J. D., Moore, M. D., Olsen, R. W., and Fanselow, M. S. (2014). The role of the δ GABA(A) receptor in ovarian cycle-linked changes in hippocampus-dependent learning and memory. *Neurochem. Res.* 39, 1140–1146. doi: 10.1007/s11064-014-1282-6.
- Davenport, C. M., Rajappa, R., Katchan, L., Taylor, C. R., Tsai, M. C., Smith, C. M., et al. (2021). Relocation of an Extrasynaptic GABAA Receptor to Inhibitory Synapses Freezes Excitatory Synaptic Strength and Preserves Memory. *Neuron* 109, 123-134.e4. doi:

10.1016/j.neuron.2020.09.037.

Essrich, C., Lorez, M., Benson, J. A., Fritschy, J., and Lüscher, B. (1998). 1998, Essrich. 563–571.

Farrant, M., and Nusser, Z. (2005). Variations on an inhibitory theme: Phasic and tonic activation of GABA A receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 215–229. doi: 10.1038/nrn1625.

Flores, C. E., Nikonenko, I., Mendez, P., Fritschy, J. M., Tyagarajan, S. K., and Muller, D. (2015). Activity-dependent inhibitory synapse remodeling through gephyrin phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E65–E72. doi: 10.1073/pnas.1411170112.

Glykys, J., Mann, E. O., and Mody, I. (2008). Which GABAA receptor subunits are necessary for tonic inhibition in the hippocampus? *J. Neurosci.* 28, 1421–1426. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4751-07.2008.

Glykys, J., and Mody, I. (2007a). Activation of GABAA Receptors: Views from Outside the Synaptic Cleft. *Neuron* 56, 763–770. doi: 10.1016/j.neuron.2007.11.002.

Glykys, J., and Mody, I. (2007b). The main source of ambient GABA responsible for tonic inhibition in the mouse hippocampus. *J. Physiol.* 582, 1163–1178. doi: 10.1113/jphysiol.2007.134460.

Govindpani, K., Turner, C., Waldvogel, H. J., Faull, R. L. M., and Kwakowsky, A. (2020). Impaired expression of gaba signaling components in the alzheimer’s disease middle temporal gyrus. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1–19. doi: 10.3390/ijms21228704.

He, Q., Duguid, I., Clark, B., Panzanelli, P., Patel, B., Thomas, P., et al. (2015). Interneuron- and GABAA receptor-specific inhibitory synaptic plasticity in cerebellar Purkinje cells. *Nat. Commun.* 6, 1–13. doi: 10.1038/ncomms8364.

Hirose, S. (2014). *Mutant GABAA receptor subunits in genetic (idiopathic) epilepsy*. 1st ed. Elsevier B.V. doi: 10.1016/B978-0-444-63326-2.00003-X.

Ibata, K., Sun, Q., and Turrigiano, G. G. (2008). Rapid Synaptic Scaling Induced by Changes in Postsynaptic Firing. *Neuron* 57, 819–826. doi: 10.1016/j.neuron.2008.02.031.

- Jacob, T. C., Moss, S. J., and Jurd, R. (2008). GABAA receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 331–343. doi: 10.1038/nrn2370.
- Klausberger, T., and Somogyi, P. (2008). Neuronal diversity and temporal dynamics: The unity of hippocampal circuit operations. *Science* (80-.). 321, 53–57. doi: 10.1126/science.1149381.
- Kneussel, M., and Betz, H. (2000). Receptors, gephyrin and gephyrin-associated proteins: Novel insights into the assembly of inhibitory postsynaptic membrane specializations. *J. Physiol.* 525, 1–9. doi: 10.1111/j.1469-7793.2000.t01-4-00001.x.
- Lu, Y. M., Mansuy, I. M., Kandel, E. R., and Roder, J. (2000). Calcineurin-mediated LTD of GABAergic inhibition underlies the increased excitability of CA1 neurons associated with LTP. *Neuron* 26, 197–205. doi: 10.1016/S0896-6273(00)81150-2.
- Mangan, P. S., Sun, C., Carpenter, M., Goodkin, H. P., Sieghart, W., and Kapur, J. (2005). Cultured hippocampal pyramidal neurons express two kinds of GABA A receptors. *Mol. Pharmacol.* 67, 775–788. doi: 10.1124/mol.104.007385.
- Marsden, K. C., Beattie, J. B., Friedenthal, J., and Carroll, R. C. (2007). NMDA receptor activation potentiates inhibitory transmission through GABA receptor-associated protein-dependent exocytosis of GABAA receptors. *J. Neurosci.* 27, 14326–14337. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4433-07.2007.
- Matsui, T., Maeda, M., Doi, Y., Yonemura, S., Amano, M., Kaibuchi, K., et al. (1998). Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *J. Cell Biol.* 140, 647–657. doi: 10.1083/jcb.140.3.647.
- McKernan, R. M., and Whiting, P. J. (1996). Which GABAA-receptor subtypes really occur in the brain? *Trends Neurosci.* 19, 139–143. doi: 10.1016/S0166-2236(96)80023-3.
- Megías, M., Emri, Z., Freund, T. F., and Gulyás, A. I. (2001). Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience* 102, 527–540. doi: 10.1016/S0306-4522(00)00496-6.

- Mele, M., Costa, R. O., and Duarte, C. B. (2019). Alterations in GABAA-receptor trafficking and synaptic dysfunction in brain disorders. *Front. Cell. Neurosci.* 13, 1–16. doi: 10.3389/fncel.2019.00077.
- Mody, I., and Pearce, R. A. (2004). Diversity of inhibitory neurotransmission through GABA A receptors. *Trends Neurosci.* 27, 569–575. doi: 10.1016/j.tins.2004.07.002.
- Mulkey, R. M., Endo, S., Shenolikar, S., and Malenka, R. C. (1994). Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature* 369, 486–488. doi: 10.1038/369486a0.
- Navarro, J. F., Burón, E., and Martín-López, M. (2002). Anxiogenic-like activity of L-655,708, a selective ligand for the benzodiazepine site of GABAA receptors which contain the alpha-5 subunit, in the elevated plus-maze test. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 26, 1389–1392. doi: 10.1016/S0278-5846(02)00305-6.
- Nicoll, R. A., and Roche, K. W. (2013). Long-term potentiation: Peeling the onion. *Neuropharmacology* 74, 18–22. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.02.010.
- Nusser, Z., and Mody, I. (2002). Selective modulation of tonic and phasic inhibitions in dentate gyrus granule cells. *J. Neurophysiol.* 87, 2624–2628. doi: 10.1152/jn.2002.87.5.2624.
- Nutt, D., King, L. A., Saulsbury, W., and Blakemore, C. (2007). Development of a rational scale to assess the harm of drugs of potential misuse. *Lancet* 369, 1047–1053. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60464-4.
- Panzanelli, P., Gunn, B. G., Schlatter, M. C., Benke, D., Tyagarajan, S. K., Scheiffele, P., et al. (2011). Distinct mechanisms regulate GABA A receptor and gephyrin clustering at perisomatic and axo-axonic synapses on CA1 pyramidal cells. *J. Physiol.* 589, 4959–4980. doi: 10.1113/jphysiol.2011.216028.
- Papadopoulos, T., Korte, M., Eulenburg, V., Kubota, H., Retiounskaia, M., Harvey, R. J., et al. (2007). Impaired GABAergic transmission and altered hippocampal synaptic plasticity in collybistin-deficient mice. *EMBO J.* 26, 3888–3899. doi: 10.1038/sj.emboj.7601819.
- Park, K., Lee, J., Jang, H. J., Richards, B. A., Kohl, M. M., and Kwag, J. (2020). Optogenetic activation of parvalbumin and somatostatin interneurons selectively restores theta-nested

- gamma oscillations and oscillation-induced spike timing-dependent long-Term potentiation impaired by amyloid β oligomers. *BMC Biol.* 18, 1–20. doi: 10.1186/s12915-019-0732-7.
- Pelkey, K. A., Chittajallu, R., Craig, M. T., Tricoire, L., Wester, J. C., and McBain, C. J. (2017). Hippocampal gabaergic inhibitory interneurons. *Physiol. Rev.* 97, 1619–1747. doi: 10.1152/physrev.00007.2017.
- Petrini, E. M., Ravasenga, T., Hausrat, T. J., Iurilli, G., Olcese, U., Racine, V., et al. (2014). Synaptic recruitment of gephyrin regulates surface GABA A receptor dynamics for the expression of inhibitory LTP. *Nat. Commun.* 5. doi: 10.1038/ncomms4921.
- Pirker, S. (2000). Neuroscience 2000 Pirker. 101, 1–36. Available at: papers2://publication/uuid/8B3931CC-CB6F-4C2F-8CED-BF35D92B9754.
- Prut, L., Prenosil, G., Willadt, S., Vogt, K., Fritschy, J. M., and Crestani, F. (2010). A reduction in hippocampal GABAA receptor $\alpha 5$ subunits disrupts the memory for location of objects in mice. *Genes, Brain Behav.* 9, 478–488. doi: 10.1111/j.1601-183X.2010.00575.x.
- R. Atack, J. (2011). GABAA Receptor Subtype-Selective Modulators. II. $\alpha 5$ -Selective Inverse Agonists for Cognition Enhancement. *Curr. Top. Med. Chem.* 11, 1203–1214. doi: 10.2174/156802611795371314.
- Rannals, M. D., and Kapur, J. (2011). Homeostatic strengthening of inhibitory synapses is mediated by the accumulation of GABA A receptors. *J. Neurosci.* 31, 17701–17712. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4476-11.2011.
- Saiepour, L., Fuchs, C., Patrizi, A., Sassoè-Pognetto, M., Harvey, R. J., and Harvey, K. (2010). Complex role of collybistin and gephyrin in GABA_A receptor clustering. *J. Biol. Chem.* 285, 29623–29631. doi: 10.1074/jbc.M110.121368.
- Saliba, R. S., Kretschmannova, K., and Moss, S. J. (2012). Activity-dependent phosphorylation of GABAA receptors regulates receptor insertion and tonic current. *EMBO J.* 31, 2937–2951. doi: 10.1038/emboj.2012.109.
- Schulz, J. M., Knoflach, F., Hernandez, M. C., and Bischofberger, J. (2018). Dendrite-targeting interneurons control synaptic NMDA-receptor activation via nonlinear $\alpha 5$ -GABAA receptors. *Nat. Commun.* 9. doi: 10.1038/s41467-018-06004-8.

- Semyanov, A., Walker, M. C., and Kullmann, D. M. (2003). GABA uptake regulates cortical excitability via cell type-specific tonic inhibition. *Nat. Neurosci.* 6, 484–490. doi: 10.1038/nn1043.
- Sieghart, W. (2000). Unraveling the function of GABA(A) receptor subtypes. *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 411–413. doi: 10.1016/S0165-6147(00)01564-9.
- Sieghart, W., and Savić, M. M. (2018). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CVI: GABA A Receptor Subtype- and Function-selective Ligands: Key Issues in Translation to Humans. *Pharmacol. Rev.* 70, 836–878. doi: 10.1124/pr.117.014449.
- Stell, B. M., and Mody, I. (2002). Receptors with different affinities mediate phasic and tonic GABA(A) conductances in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 22, 1–5. doi: 10.1523/jneurosci.22-10-j0003.2002.
- Sun, C., Sieghart, W., and Kapur, J. (2004). Distribution of $\alpha 1$, $\alpha 4$, $\gamma 2$, and δ subunits of GABA A receptors in hippocampal granule cells. *Brain Res.* 1029, 207–216. doi: 10.1016/j.brainres.2004.09.056.
- Turrigiano, G. G. (1999). Homeostatic plasticity in neuronal networks: The more things change, the more they stay the same. *Trends Neurosci.* 22, 221–227. doi: 10.1016/S0166-2236(98)01341-1.
- Tyagarajan, S. K., Ghosh, H., Yévenes, G. E., Imanishi, S. Y., Zeilhofer, H. U., Gerrits, B., et al. (2013). Extracellular signal-regulated kinase and glycogen synthase kinase 3β regulate gephyrin postsynaptic aggregation and GABAergic synaptic function in a calpain-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 288, 9634–9647. doi: 10.1074/jbc.M112.442616.
- Udakis, M., Pedrosa, V., Chamberlain, S. E. L., Clopath, C., and Mellor, J. R. (2020). Interneuron-specific plasticity at parvalbumin and somatostatin inhibitory synapses onto CA1 pyramidal neurons shapes hippocampal output. *Nat. Commun.* 11. doi: 10.1038/s41467-020-18074-8.
- Vithlani, M., Terunuma, M., and Moss, S. J. (2011). The dynamic modulation of GABAa receptor trafficking and its role in regulating the plasticity of inhibitory synapses. *Physiol. Rev.* 91, 1009–1022. doi: 10.1152/physrev.00015.2010.

- Voss, P., Thomas, M. E., Cisneros-Franco, J. M., and de Villers-Sidani, É. (2017). Dynamic brains and the changing rules of neuroplasticity: Implications for learning and recovery. *Front. Psychol.* 8, 1–11. doi: 10.3389/fpsyg.2017.01657.
- Whissell, P. D., Eng, D., Lecker, I., Martin, L. J., Wang, D. S., and Orser, B. A. (2013). Acutely increasing δ GABAA receptor activity impairs memory and inhibits synaptic plasticity in the hippocampus. *Front. Neural Circuits* 7, 1–12. doi: 10.3389/fncir.2013.00146.
- Wiera, G., Lebida, K., Lech, A. M., Brzdak, P., Van Hove, I., De Groef, L., et al. (2020). Long-term plasticity of inhibitory synapses in the hippocampus and spatial learning depends on matrix metalloproteinase 3. *Cell. Mol. Life Sci.* doi: 10.1007/s00018-020-03640-6.
- Wyroślak, M., Dobrzanski G., Mozrzykas JW (2023) Bidirectional plasticity of GABAergic tonic inhibition in hippocampal somatostatin- and parvalbumin-containing interneurons. *Front. Cell. Neurosci.* 17:1193383. doi: 10.3389/fncel.2023.1193383
- Wyroślak, M., Lebida, K., and Mozrzykas, J. W. (2021). Induction of Inhibitory Synaptic Plasticity Enhances Tonic Current by Increasing the Content of $\alpha 5$ -Subunit Containing GABAA Receptors in Hippocampal Pyramidal Neurons. *Neuroscience* 467, 39–46. doi: 10.1016/j.neuroscience.2021.05.020.
- Yee, B. K., Hauser, J., Dolgov, V. V., Keist, R., Möhler, H., Rudolph, U., et al. (2004). GABAA receptors containing the $\alpha 5$ subunit mediate the trace effect in aversive and appetitive conditioning and extinction of conditioned fear. *Eur. J. Neurosci.* 20, 1928–1936. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03642.x.

WYKAZ RYCIN

Ryc. 1 Wzory wyładowań badanych typów komórek nerwowych w odpowiedzi na bodziec prądowy.	24
Ryc. 2 Przebieg odpowiedzi błony komórkowej na hiperpolaryzujący -25 pA impuls prądowy w czasie 300 ms	24
Ryc. 3 Rycina przedstawiająca metody analizy parametrów potencjału czynnościowego komórki nerwowej.....	25
Ryc. 4 Rycina przedstawiająca przykładowy pomiar prądu tonicznego.....	27
Ryc. 5 Rycina przedstawiająca pomiar prądu tonicznego wzmocnionego podaniem etomidatu z zastosowaniem L-655,708	28

ZAŁĄCZNIKI

1. Dorobek naukowy

Wykaz publikacji

Pełne prace

1. **Wyroślak M.**, Lebida L., Mozzymas JW. (2021) Induction of Inhibitory Synaptic Plasticity Enhances Tonic Current by Increasing the Content of $\alpha 5$ -Subunit Containing GABAA Receptors in Hippocampal Pyramidal Neurons. *Neuroscience* 15;467:39-46. doi: 10.1016/j.neuroscience.2021.05.020
Punkty MEiN: 140pkt.
IF: 3.708
2. **Wyroślak M.**, Dobrzański G., Mozzymas JW. (2023) Bidirectional plasticity of GABAergic tonic inhibition in hippocampal somatostatin- and parvalbumin-containing interneurons. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 17:1193383 doi: 10.3389/fncel.2023.1193383
Punkty MEiN: 100pkt.
IF: 6.147
3. Brzdąk P., Lebida K., **Wyroślak M.**, Mozzymas JW. (2023) GABAergic synapses onto SST and PV interneurons in the CA1 hippocampal region show cell-specific and integrin-dependent plasticity. *Scientific Reports* 13,5079 doi: 10.1038/s41598-023-31882-4
Punkty MEiN: 140pkt.
IF: 4.996

Konferencje naukowe

1. **Wyroslak M.**, Kowzan M., Sirocka I., Ptaszek K. The electrical stimulation of the raphe magnus affect rats behaviours but has no influence on immune cells. 6th International Conference Aspects of Neuroscience 25-27 listopada 2016, Warszawa, Polska; plakat
2. Sirocka I., **Wyroslak M.**, Ptaszek K. Does the serotonergic system impairments affect the development of psychiatric disorders? 6th International Conference Aspects of Neuroscience 25-27 listopada 2016, Warszawa, Polska; plakat
3. **Wyroslak M.**, Ptaszek K., The influence of the serotonergic system activation in the brain on the peripheral immunity level in rats. XIII international conference Youth and Progress of Biology 19-21 kwietnia 2016, Lwów, Ukraina; wystąpienie
4. Dunacka J., Marchewka J., Świątek G., **Wyroslak M.**, Grałek M., Wrona D. Differentiation of spontaneous locomotor activity affects the spatial reference memory level in Water Morris test in rats. 19-22 czerwca 2018 Gdańsk, Polska, artykuł w czasopiśmie pokonferencyjnym Applied Biosciences 1;1 (2018)
5. Świątek G., Dunacka J., **Wyroslak M.**, Grałek M., Marchewka J., Majkutewicz I., Grembecka B., Glac W., Wrona D. Dimethyl fumarate affects spleen lymphocyte production of interleukin 10 in streptozotocin-induced model of Alzheimer's disease in rats. Artykuł w czasopiśmie pokonferencyjnym European Neuropsychopharmacology 29, S1 (2019)

ŁĄCZNY IMPACT FACTOR: 14.851 (LICZBA PRAC: 3)

LICZBA PUNKTÓW MEiN: 380

2. Oświadczenia współautorów

Prof. dr hab. Jerzy W. Mozrzyimas
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
Katedra i Zakład Biofizyki i Neurobiologii
ul. T. Chałubińskiego 3a, 50-368 Wrocław

Wrocław, 26.06.2023

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Wyrosłak Marcin, Katarzyna Lebida, Jerzy W. Mozrzyimas: **Induction of Inhibitory Synaptic Plasticity Enhances Tonic Current by Increasing the Content of $\alpha 5$ -Subunit Containing GABAA Receptors in Hippocampal Pyramidal Neurons**

Neuroscience (2021) 15;467:39-46. doi: 10.1016/j.neuroscience.2021.05.020

Mój wkład polegał na opracowaniu i koncepcji projektu grantowego OPUS UMO-2018/31/B/NZ4/01998 będącego podstawą dla przeprowadzonych badań oraz uzyskaniu finansowania z Narodowego Centrum Nauki, nadzorze i konsultacjach merytorycznych związanych z realizacją założeń badawczych, udziale w projektowaniu metodologii eksperymentalnych, analizie danych oraz pisaniu pierwotnej wersji artykułu i redagowaniu jego ostatecznej wersji.

Prof. dr hab. Jerzy W. Mozrzyimas
KATEDRA I ZAKŁAD
BIOFIZYKI I NEUROBIOLOGII
kierownik
Prof. dr hab. Jerzy W. Mozrzyimas

Oświadczam, że w pracy:

Wyrosłak Marcin, Grzegorz Dobrzański, Jerzy W. Mozrzyimas: **Bidirectional plasticity of GABAergic tonic inhibition in hippocampal somatostatin- and parvalbumin-containing interneurons**

Frontiers in Cellular Neuroscience (2023) Vol. 17 doi: 10.3389/fncel.2023.1193383

Mój wkład polegał na opracowaniu i koncepcji projektu grantowego OPUS UMO-2018/31/B/NZ4/01998 będącego podstawą dla przeprowadzonych badań oraz uzyskaniu finansowania z Narodowego Centrum Nauki, nadzorze i konsultacjach merytorycznych związanych z realizacją założeń badawczych, udziale w projektowaniu metodologii eksperymentalnych, analizie danych oraz pisaniu pierwotnej wersji artykułu i redagowaniu jego ostatecznej wersji.

Prof. dr hab. Jerzy W. Mozrzyimas
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD
BIOFIZYKI I NEUROBIOLOGII
kierownik
Prof. dr hab. Jerzy W. Mozrzyimas

Dr Katarzyna Lebida
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
Katedra i Zakład Biofizyki i Neurobiologii
ul. T. Chałubińskiego 3a, 50-368 Wrocław

Wrocław, 04.04.2023

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

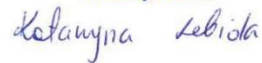
Wyrosłak Marcin, Katarzyna Lebida, Jerzy W. Mozrzymas: **Induction of Inhibitory Synaptic Plasticity Enhances Tonic Current by Increasing the Content of α 5-Subunit Containing GABAA Receptors in Hippocampal Pyramidal Neurons.**

Neuroscience (2021) 15;467:39-46. doi: 10.1016/j.neuroscience.2021.05.020

Mój wkład polegał na udziale w projektowaniu metodologii eksperymentalnej wykorzystywanej w badaniach, analizie danych z pomiarów elektrofizjologicznych oraz udziale w pisaniu pierwotnej wersji artykułu.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD
BIOFIZYKI I NEUROBIOLOGII
asystent

dr Katarzyna Lebida



Dr Grzegorz Dobrzański

Wrocław, 28.06.2023

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Wyroslak Marcin, Grzegorz Dobrzański, Jerzy W. Mozzymas: **Bidirectional plasticity of GABAergic tonic inhibition in hippocampal somatostatin- and parvalbumin-containing interneurons**

Frontiers in Cellular Neuroscience (2023) Vol. 17:1193383 doi: 10.3389/fncel.2023.1193383

Mój wkład polegał na zapewnianiu wsparcia metodologicznego wykonanych badań. Ponadto, brałem udział w przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu.

Dr Grzegorz Dobrzański

