

Diss. ETH No: 15890

**Dual approach to study the impact of glycine-
mediated modulation of glutamatergic
transmission on behaviour**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY, ZURICH
For the degree of
Doctor of Natural Science

Presented by

Aubin Michalon

Biologist

Master degree in Biotechnology,
Ecole Supérieure de Biotechnologie,
Université Louis Pasteur, Strasbourg, France
Born February 7th 1978, in N'Djaména (Tchad)

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Isabelle Mansuy, examiner
Prof. Dr. Wolf Singer, coexaminer
Prof. Dr. Hanns Möhler, coexaminer

2005

Summary

Glutamate is the most important neurotransmitter in the brain, mediating up to 60 % of all synaptic neurotransmission. Among the different types of glutamate receptors, the N-methyl D-aspartate (NMDA) receptors, which are present in almost all glutamatergic synapses, have very specific properties conferring them critical roles in multiple brain processes. NMDA receptors are able to detect coincident neuronal activity and are strongly connected to intracellular signalling. In addition, NMDA receptors play a major role in synaptic plasticity, supporting most cognitive processes like learning and memory, what suggested that NMDA receptor malfunction could be involved in the pathophysiology of neuropsychiatric disorders. In this respect, the hypothesis of NMDA receptor hypofunction has gained much favour as one of the causative agents in schizophrenia.

It was recently discovered that the regulation of NMDA receptor activity could occur *in vivo* by modulating synaptic glycine concentration, a process mediated by glycine transporter 1 (GLYT1). To better understand this specific mechanism and its implication on cognitive processes and behaviour, we proposed a dual genetic approach to up- and down-regulate GLYT1 activity *in vivo*, and evaluate the impact on behaviour.

To up-regulate GLYT1 activity, we generated transgenic mice overexpressing GLYT1 specifically in forebrain neurons, using the tetracycline controlled transactivator system (tTA) to regulate GLYT1 expression. This genetic manipulation was expected to reduce synaptic glycine concentration leading to a reduction in NMDA receptor activation. Because NMDA receptor hypofunction is possibly involved in the etiopathology of schizophrenia, GLYT1 overexpressing mice, or tTA-Glyt1 mice, were evaluated on a series of behavioural tests assessing exploratory activity, anxiety, learning and memory and sensorimotor gating abilities. However, in all these tests, namely the open field, elevated plus maze, Morris water maze, novel object recognition task and prepulse inhibition paradigm, control and tTA-Glyt1 mice displayed similar performances. To understand this absence of phenotype, we undertook a biochemical investigation, which revealed that synaptic glycine transport was not augmented in tTA-Glyt1 mice, and that the amount of GLYT1 protein was not increased in cell-body and synaptosomal fractions. These observations suggested that the mRNA of the transgenic Glyt1 gene, whose expression was detected in forebrain structures, was not translated into active GLYT1 protein.

To investigate GLYT1 down-regulation, we obtained by collaboration mice heterozygous for the Glyt1 knockout allele (Glyt1 +/- mice). Because of gene dosage effect, these mice displayed 50 % reduction in GLYT1 activity, suggesting that synaptic glycine concentration and NMDA receptor activity would be augmented. The behaviour of Glyt1 +/- mice was evaluated in the open field, elevated plus maze, home-cage and prepulse inhibition tests. The sensorimotor gating ability of Glyt1 +/- mice was significantly reduced by 38 % compared to wild-type mice, the anxiety level was normal, and the spontaneous locomotor activity was increased in the open field, decreased in the elevated plus maze, and normal in the home-cage. Complementary electrophysiological experiments would be necessary to determine the mechanisms that impaired the sensorimotor gating ability.

Finally, a transgenic mouse line was generated, which expressed the new reverse tetracycline controlled transactivator (rtTA2) in forebrain neurons. This mouse line that permits inducible gene expression, is now being used in our laboratory and by collaborators.

Résumé

Le glutamate, le neurotransmetteur le plus abondant dans le cerveau, est responsable de plus de 60 % des transmissions synaptiques. Les récepteurs au glutamate du type N-méthyl D-aspartate (NMDA) sont présents dans la grande majorité des synapses glutamatergiques et possèdent des propriétés très spécifiques qui en font les acteurs majeurs de nombreux processus neuronaux. Par exemple, grâce à leur capacité à détecter l'activité synchrone des neurones et leur perméabilité aux ions calcium, les récepteurs au NMDA ont un rôle pivot dans les processus de plasticité synaptique, l'apprentissage et la mémoire et la cognition. Du fait de la multiplicité des fonctions dans lesquelles les récepteurs au NMDA sont impliqués, tout dysfonctionnement est susceptible de provoquer des troubles neurologiques. Ainsi, il a été suggéré qu'une réduction de l'activité des récepteurs au NMDA participe à l'étiologie de la schizophrénie.

Un nouveau mécanisme de régulation de l'activité des récepteurs au NMDA par la glycine a été mis en évidence récemment, et il y a été démontré que les transporteurs de la glycine 1 (GLYT1) contrôlent la concentration synaptique en glycine. Afin d'étudier ce mécanisme de régulation ainsi que son implication dans les processus cognitifs et le contrôle du comportement, nous avons utilisé une double approche génétique chez la souris permettant dans un cas d'augmenter, et dans l'autre cas de diminuer l'activité de GLYT1

Afin d'augmenter l'activité de GLYT1 *in vivo*, nous avons généré des souris transgéniques (nommées tTA-Glyt1) qui surexpriment GLYT1 de manière spécifique et contrôlée dans les neurones du cerveau antérieur. Il était anticipé que l'accroissement de l'activité de GLYT1 diminuerait la concentration synaptique en glycine, et ainsi diminuerait l'activité des récepteurs au NMDA. En rapport avec l'hypothèse d'une faible activité des récepteurs au NMDA comme cause participant à la schizophrénie, le comportement des souris tTA-Glyt1 a été évalué sur des tests qui mesurent la locomotion spontanée, l'anxiété, l'apprentissage et la mémoire, et la capacité de filtration sensorielle. Dans les tests de l'open field, du labyrinthe en croix surélevé, de la piscine de Morris, de la reconnaissance d'objet nouveau et de l'inhibition du sursaut, les souris tTA-Glyt1 se sont comportées de manière identique aux souris contrôles. Pour comprendre cette absence de phénotype, nous avons fait des mesures biochimiques qui ont révélées que l'expression du transgène codant pour GLYT1, démontrée par RT-

PCR, n'induisait pas d'augmentation de la quantité de GLYT1, et donc pas d'augmentation de son activité.

Afin d'étudier l'effet d'une diminution de l'activité de GLYT1, des souris hétérozygotes pour la délétion du gène Glyt1 (nommées Glyt1 +/-) ont été obtenues par collaboration. Dans le test d'inhibition du sursaut, les souris Glyt1 +/-, qui arborent une diminution de 50 % de l'activité de GLYT1, ont montré une réduction de 38 % de la capacité de filtration sensorielle. Dans l'open field et le labyrinthe en croix surélevé, les niveaux d'anxiété étaient normaux. L'activité locomotrice était augmentée dans l'open field et diminuée dans le labyrinthe en croix surélevé, mais normale dans la cage. Des expériences complémentaires d'électrophysiologie seraient nécessaires pour analyser plus en détail le mécanisme de cette diminution de la capacité de filtration sensorielle.

Enfin, une lignée de souris transgéniques a été générée, qui exprime le nouvel activateur de transcription contrôlé par la tétracycline (rtTA2) de manière spécifique dans les neurones du cerveau antérieur. Ces souris permettent le contrôle précis de l'expression d'un transgène par administration de doxycycline et sont désormais utilisées dans notre laboratoire et par des collaborateurs.