



Doctoral Thesis

Modulation of cognitive behaviour in mice via targeted molecular and systemic pharmacological interference of glycine transporter 1 function

Author(s):

Singer, Philipp

Publication Date:

2008

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005774898> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS.ETH NO: 17923

**Modulation of Cognitive Behaviour in Mice via Targeted Molecular
and Systemic Pharmacological Interference of Glycine Transporter 1
Function**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY (ETH) ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

PHILIPP SINGER

Dipl. Natw. ETH; Swiss Federal Institute of Technology (ETH) Zurich

Born October 31st, 1978

Citizen of Switzerland

accepted on the recommendation of:

Prof. Dr. Joram Feldon, examiner

Dr. David M. Bannerman, co-examiner

Dr. Benjamin K. Yee, co-examiner

2008

Summary

The N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) assumes a pivotal role in synaptic plasticity, learning and memory (Tang et al., 1999), and impaired NMDAR function has been implicated in a number of cognitive disorders and neuropsychiatric diseases including schizophrenia (c.f. Javitt 2007). This has generated growing interest in agents that enhance NMDAR activation in order to alleviate cognitive deficiency or to achieve cognitive enhancement in otherwise healthy individuals. NMDAR activation requires the simultaneous binding of glutamate and the co-agonist glycine (McBain and Mayer 1994). Local glycine levels at NMDAR-containing glutamatergic synapses are tightly regulated by the glycine transporter 1 (GlyT1) which mediates the re-uptake of synaptic glycine into the cytosol (Cubelos et al., et al., 2005; Gomeza et al., 2003). Inhibition of GlyT1 and its resulting increase in extra-cellular glycine therefore provides a promising approach to augment NMDAR activation via enhanced occupancy of the glycine binding site.

The overall basic question the present thesis sought to address was to evaluate the impact of reduced GlyT1 function on NMDAR mediated transmission and the expression of higher cognitive behaviour including learning and memory, and to evaluate whether such interventions may prove useful to enhance cognitive functions in non-clinical situations. To achieve this, we made extensive use of genetically engineered mice with a specific functional defect of GlyT1 due to molecular deletion of the GlyT1 gene. To this end, two conditional GlyT1 knockout mouse lines were generated with either neuron or neuron and glia specific loss of GlyT1 in the forebrain, thus allowing us to compare the *in vivo* regulatory functions of neuronal and global (neuron and glia) GlyT1. This was complemented by a pharmacological approach using the selective GlyT1 inhibitor SSR504734 by which the acute short-term effect of GlyT1 inhibition in wild-type mice can be examined.

The first series of experiments revealed that GlyT1 disruption restricted to forebrain neurons increased NMDAR currents and enhanced cognitive functions across a variety of learning situations. The mutation led to enhanced associative learning, and it improved object recognition memory when the demand on retention was high (Appendix I, Chapter 2). This was accompanied by increased latent inhibition (LI) effect pointing towards enhanced flexibility in associative learning in the mutant mice (Appendix I). Furthermore, the mutation facilitated new learning under conditions of high levels proactive interference (Chapter 3). These findings indicate that forebrain neuronal GlyT1 deletion does not indiscriminately strengthen the expression of learned behaviour at the expense of selectivity and flexibility in learning. In contrast, flexibility was actually enhanced. Hence, the constellation of behavioural phenotypes identified by the first series of experiments is suggestive of a general enhancement in behavioural adaptability. In addition, neuron-specific GlyT1 disruption in forebrain reduced the responsiveness to the motor stimulating effect of psychomimetic drugs (Appendix I and II), which is suggestive of an antipsychotic profile of mutation.

The next series of experiments evaluated the effect of complete forebrain specific GlyT1 disruption on NMDAR function and memory processes, providing a comparison to the more specific forebrain

neuronal GlyT1 deletion (Chapters 4-6). A functional impact of the mutation on NMDAR function was evidenced by a near-complete absence of a response to NMDAR blockade by PCP presumably due to increased synaptic glycine, which was supported by a drastic reduction in GlyT1 specific glycine re-uptake implying an increase in extra-cellular glycine. A pro-cognitive effect of the mutation was revealed on working memory and object recognition memory. Associative learning, on the other hand, was not enhanced in the mutant mice. Furthermore, the altered NMDAR properties did not translate into enhanced hippocampal NMDAR currents as previously seen in mice lacking GlyT1 specifically in forebrain neurons. This constitutes a notable physiological difference between the two GlyT1 knockout mouse lines which may account for their phenotypic differences and the wider range of effects associated with forebrain neuronal loss of GlyT1. These findings demonstrate that inhibition of GlyT1 represents a feasible approach to modulate learning and memory, and specifically illustrate the differential impacts on cognitive processes via forebrain selective (neuron vs. neuron plus glia) GlyT1-targeted manipulations. This possibly points towards a functional dissociation between neuronal and non-neuronal GlyT1 in the regulation of higher cognitive behaviour which is highly instructive for the design of novel GlyT1 inhibitors aiming at enhancing cognitive functions.

In order to further dissect the cognitive effects of complete and neuronal GlyT1 deletion in forebrain additional cognitive tests were conducted which revealed other phenotypic differences between the two GlyT1 knockout lines. First, the expression of prepulse inhibition (PPI), a measure of sensorimotor gating (e.g. Braff and Geyer 1990), was attenuated when GlyT1 deletion was restricted to forebrain neurons, but was unaffected when GlyT1 was disrupted in a cell-type non-specific manner throughout the forebrain (Chapter 5). Second, defect of neuronal but not complete GlyT1 deletion in forebrain exerted multiple effects on associative learning in a series of Pavlovian conditioned freezing procedures (Chapter 6). The results of these experiments showed that forebrain neuronal GlyT1 disruption increased both the magnitude and the persistence of the conditioned freezing response to a discrete conditioned tone stimulus (CS) previously having been paired with a foot shock unconditioned stimulus (US) and enhanced contextual fear when the animals were explicitly conditioned to a novel context in the absence of any discrete CS. Again, such excessive conditioned responding was not realized at the cost of selectivity in associative learning because the sensitivity to the trace conditioning effect, in which a protracted interval between the offset of the conditioned stimulus (CS) and the onset of the unconditioned stimulus (US) attenuates the subsequent conditioned responding to the CS, was more pronounced in the mutant mice. This pattern of results lends further support to the suggestion that specific GlyT1 deletion in forebrain neurons can facilitate selectivity in associative learning, and may be indicative of enhanced cognitive flexibility, rather than a simple strengthening of any potential associative links between stimuli.

The last series of experiments was designed to evaluate the behavioural effects of systemic GlyT1 blockade achieved by SSR504734, a selective GlyT1 inhibitor which has been shown to enhance NMDAR function (Depoortère et al., 2005). SSR504734's promnesic potential was assessed on

working memory function using an automated operant continuous delayed alternation task (Chapter 7). The results showed that SSR504734 enhanced working memory performance in a dose- and delay-dependent manner. This is in agreement with the working memory enhancement previously seen in complete forebrain specific GlyT1 knockout mice indicating that GlyT1 inhibition/deletion in a cell-type non-specific manner constitutes a feasible approach to improve working memory. The effect of SSR504734 on the responsiveness to psychomimetic drug challenge was examined in Appendix IV and V. It was found that SSR504734 attenuated the motor-stimulant effect of PCP (Appendix IV), but exacerbated the behavioural effects induced by dopaminergic agonists (Appendix IV and V, also see Depoortère et al., 2005). This may indicate that the more direct impact of GlyT1 blockade on NMDAR-mediated glutamatergic neurotransmission can subsequently lead to changes in dopaminergic activity which may contribute to the behavioural effects of SSR504734.

Together, the experimental investigations presented in this thesis provide clear evidence that inhibition of GlyT1 can lead to some forms of cognitive enhancement, but the emergence of such effects is largely dependent on its selective inhibition/deletion in forebrain neurons as opposed to complete forebrain GlyT1 deletion. The effects of forebrain neuronal GlyT1 deletion are beyond merely strengthening memory of things past (e.g. enhanced object recognition memory), but are realized in tune with on-going purposeful behaviour resulting in enhanced adaptability to changes that lead to a current goal, as evidenced by improved reversal or new-learning in the water maze and the T-maze (Chapter 3). These findings lend support to the suggestion that inhibition of GlyT1 may represent a promising strategy to modulate cognitive behaviour with potential applications in the treatment of cognitive impairments in a number of diseases and for non-clinical purposes to boost mental functions in otherwise healthy people or to halt cognitive decline in normal ageing.

On the other hand, the attenuation of PPI by GlyT1 deletion in forebrain neurons and the potentiation of dopamine agonists induced behaviours by pharmacological GlyT1 blockade may be interpreted as signs linked to schizophrenia, which is contrary to the antipsychotic profile of GlyT1 inhibition revealed in other tests (Appendix I and II, Chapter 4). This illustrates that any change in cognitive behaviour may lead to both beneficial and harmful effects, including possible tradeoffs when enhancement of one function may lead to a malfunction of another. Thus, these costs and benefits are situation-dependent, and their balance needs to be subjected to empirical testing.

Finally, the precise mechanisms in which these changes in cognitive functions are realized in terms of brain-circuitry remain poorly understood. Selectivity of the GlyT1 molecular deletion therefore requires further refinement in its expression to advance in this direction.

Zusammenfassung

Es wird vermutet, dass der N-methyl-D-aspartate Rezeptor (NMDAR) entscheidend in synaptische Plastizität, Lernen und Erinnerung involviert ist (Tang et al., 1999). Eine eingeschränkte Funktion des NMDAR steht deshalb im Zusammenhang zu einer Reihe von kognitiven Störungen und neuropsychiatrischen Erkrankungen, inklusive Schizophrenie (c.f. Javitt 2007). Aus diesem Grund hat das Interesse an Substanzen, welche die NMDAR-Aktivierung verbessern, stark zugenommen; dies vor dem Hintergrund, dass dadurch kognitive Mängel verbessert oder aber die Leistungen ansonsten gesunder Individuen gesteigert werden könnten.

Die Aktivierung des NMDAR benötigt das gleichzeitige Binden von Glutamat und des Ko-Agonisten Glycin (McBain and Mayer 1994). Die lokalen Glycin-Konzentrationen an glutamatergen Synapsen, welche NMDAR enthalten, werden sehr genau durch den Glycin Transporter 1 (GlyT1) reguliert, der die Wiederaufnahme von Glycin aus dem synaptischen Spalt ins Zytosol kontrolliert (Cubelos et al., et al., 2005; Gomeza et al., 2003). Eine Blockierung des GlyT1 und der daraus resultierende Anstieg an extrazellulärem Glycin ist deshalb ein vieldversprechender Ansatz, um die Aktivierung des NMDAR zu erhöhen, da dessen Glycin-Bindungsstelle vermehrt besetzt ist.

Der Hauptfokus der hier vorliegenden Doktorarbeit war darauf gerichtet zu untersuchen, inwieweit eine reduzierte Funktion des GlyT1 die durch den NMDAR vermittelte Neurotransmission sowie höheres kognitives Verhalten wie Lernen und Gedächtnis beeinflusst. Zudem sollte untersucht werden, ob solche Manipulationen zur Behandlung von kognitiven Störungen verwendet werden können oder aber ob sie zur Steigerung der kognitiven Leistungsfähigkeit in nicht-pathologischen Situationen führen. Zu diesem Zweck wurden genetisch modifizierte Mäuse untersucht, die aufgrund einer Deletion im entsprechenden Gen einen spezifischen funktionellen Defekt im GlyT1 haben. Um genauer überprüfen zu können, inwiefern sich die Funktionen von Glycin in einem Neuronenspezifischen und einem generellen Sinn (Neuronen und Glia) unterscheiden, wurden zwei spezifische knockout-Mauslinien generiert; wobei eine Linie einen generellen Ausfall der GlyT1 Funktion im gesamten Vorderhirn hatte, bei der anderen dieser Ausfall jedoch auf Neuronen des Vorderhirns beschränkt blieb. Der selektive GlyT1 Inhibitor SSR504734 wurde als ein pharmakologischer Ansatz benutzt, um die kurzfristigen Effekte einer GlyT1-Blockierung eruieren zu können.

Erste elektrophysiologische Experimente zeigten, dass eine Blockierung des GlyT1 in Neuronen des Vorderhirns zu einem erhöhten NMDAR-Strom führte, ebenso wie eine verbesserte kognitive Leistung in einer Vielzahl von Lern-Situationen nachgewiesen werden konnte. Die eingeführte Mutation führte zu einem gesteigerten assoziativen Lernen sowie zu einem verbesserten Gedächtnis bei der Erkennung neuer Objekte, wenn die Anforderung ans Gedächtnis hoch war. Zusätzlich war die Selektivität im assoziierten Lernen im latent inhibition (LI) Test erhöht, wie auch das Erlernen neuer Inhalte unter der Voraussetzung pro-aktiver Interferenz (Appendix I, Kapitel 2-3) erleichtert war. Zusammen weisen diese Resultate darauf hin, dass eine Neuronen-spezifische Deletion von GlyT1 im Vorderhirn die Bedeutung erlernten Verhaltens nicht willkürlich auf Kosten von Selektivität und

Flexibilität stärkt; die Flexibilität war im Gegenteil sogar verbessert. Die Konstellation der beobachteten Verhaltensphänotypen in der ersten Reihe von Experimenten weist darauf hin, dass eine erhöhte NMDAR Funktion zu einer generellen Verbesserung der Anpassungsfähigkeit führen könnte. Zusätzlich dazu reduzierte eine Neuronen-spezifische Deletion von GlyT1 im Vorderhirn die Empfindlichkeit gegenüber den stimulierenden Effekten psychomimetischer Substanzen (Appendix I and II), was auf einen antipsychotischen Charakter der Mutation hinweist.

Die zweite Serie von Experimenten untersuchte die Effekte einer generellen Deletion von GlyT1 im Vorderhirn in Bezug auf NMDAR Funktion und Gedächtnisprozesse, um einen wertvollen Vergleich zur Neuronen-spezifischen Deletion im Vorderhirn zu haben. Die funktionellen Auswirkungen der Mutation auf die Funktion des NMDAR konnten dadurch gezeigt werden, dass eine Blockade des NMDAR durch PCP zu praktisch keinem Effekt führte. Dies könnte ursächlich mit der erhöhten Glycin-Konzentration in der Synapse zusammenhängen, eine Ansicht, die auch dadurch unterstützt wurde, dass eine drastische Reduktion der GlyT1-spezifischen Wiederaufnahme von Glycin beobachtet wurde, was eine erhöhte extrazelluläre Glycin-Konzentration impliziert. Kognition verbessernde Effekte der Mutation wurden im Zusammenhang mit Arbeitsgedächtnis und Objekterkennung gefunden. Assoziatives Lernen andererseits war nicht verbessert in den Mutanten. Zusätzlich dazu führten die veränderten Eigenschaften des NMDAR nicht zu einem erhöhten NMDAR-Stromfluss im Hippocampus wie im Fall der Mäuse, bei denen die Funktion des GlyT1 nur in den Neuronen des Vorderhirns fehlte. Dies stellt einen bemerkenswerten Unterschied der zwei GlyT1 knockout Mauslinien dar, der die Unterschiede im Phänotyp sowie den grösseren Umfang der Effekte erklären könnte, die mit einem Neuronen-spezifischen Verlust des GlyT1 verbunden sind.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass Inhibition des GlyT1 ein nützlicher Ansatz ist, um Lernen und Gedächtnis zu modulieren sowie die verschiedenen Auswirkungen aufzuzeigen, welche selektive (neuronale vs generelle) Manipulationen am GlyT1 auf kognitive Prozesse haben. Sie könnten auch ein Hinweis darauf sein, dass es eine funktionelle Abgrenzung zwischen neuronalem und nicht-neuronalem GlyT1 in Bezug auf die Regulierung höheren kognitiven Verhaltens gibt, was äusserst aufschlussreich für das Design neuer GlyT1 Inhibitoren wäre, die auf eine Verbesserung kognitiver Funktionen ausgerichtet sind.

Mit dem Ziel, die kognitiven Effekte eines neuronalen oder generellen Verlusts von GlyT1 im Vorderhirn weiter aufzuschlüsseln, sind zusätzliche Tests durchgeführt worden, die weitere phänotypische Unterschiede zwischen den beiden GlyT1 knockout-Linien aufzeigten. Erstens war die Expression von prepulse inhibition (PPI), einem Mass für sensorimotorische Verarbeitung, abgeschwächt, wenn die Deletion von GlyT1 auf Neuronen des Vorderhirns beschränkt war; sie war aber nicht beeinträchtigt, wenn die Deletion alle Zelltypen des Vorderhirns umfasste (Kapitel 4). Zweitens hatte der Neuronen-spezifische Ausfall von GlyT1 im Vorderhirn vielfache Auswirkungen auf assoziatives Lernen in mehreren conditioned freezing Experimenten nach Pavlov. Die Resultate dieser Experimente zeigen, dass Neuronen-spezifische Deletion von GlyT1 im Vorderhirn sowohl das

Ausmass als auch die Dauer des freezing-Verhaltens gegenüber einem Ton-Stimulus steigerte, wenn dieser Ton (conditioned stimulus, CS) zuvor mit einem elektrischen Fusssschock (unconditioned stimulus, US) gepaart worden war. Zudem war das kontextbedingte freezing grösser, wenn die Tiere explizit auf einen neuen Kontext in Abwesenheit eines CS konditioniert wurden. Wie schon vorher ging auch diese überhöhte Konditionierung nicht auf Kosten assoziativen Lernens, da Die Sensitivität zum sogenannten trace conditioning Effekt sogar noch verstärkt war. Bei diesem Effekt verringert ein zunehmendes Zeitintervall zwischen der Präsentation des CS und der Verabreichung des US die spätere konditionierte Reaktion zum CS. Diese Resultate unterstützen demnach den Vorschlag weiter, wonach eine spezifische GlyT1 Deletion in Neuronen des Vorderhirns die Selektivität assoziativen Lernens erleichtern kann, und dass sie ein Index erhöhter kognitiver Flexibilität sein kann, anstatt lediglich den assoziativen Link zwischen zwei möglichen Stimuli zu verstärken.

Die letzte Serie von Experimenten wurde entworfen, um die Konsequenzen einer systemischen Blockade von GlyT1 durch SSR504734 in Bezug auf das Verhalten zu untersuchen. SSR504734 ist ein selektiver GlyT1 Inhibitor, der nachweislich die Funktion der NMDAR fördert (Depoortère et al., 2005). Die leistungssteigernde Wirkung, die SSR504734 auf das Kurzzeitgedächtnis ausübt, wurde in einem sog. continuous delayed alternation Test untersucht (Kapitel 7). Die Resultate zeigen, dass SSR504734 in Abhängigkeit sowohl von der Dosis als auch vom Zeitintervall die Leistung des Kurzzeitgedächtnisses verbessert. Dies ist in Übereinstimmung mit den ebenfalls leistungssteigernden Effekten, die in jenen Mäusen beobachtet wurden, die eine komplette, Vorderhirn-spezifische Deletion von GlyT1 aufweisen, was bedeutet, dass eine generelle Inhibition von GlyT1 ein sinnvoller Ansatz darstellt, um die Leistung des Kurzzeitgedächtnisses zu steigern.

Der Effekt von SSR504734 auf die Empfindlichkeit gegenüber psychomimetischen Substanzen wurde in den Kapiteln 8 bis 9 untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass SSR504734 den Lokomotions-stimulierenden Effekt von PCP reduziert, jenen von Dopamin-Agonisten aber verstärkt (Kapitel 7 & 8). Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass die viel direktere Wirkung einer GlyT1 Blockade auf NMDAR-abhängige glutamaterge Neurotransmission zu Veränderungen in der dopaminergen Aktivität führen könnte, was dann wiederum zu den beobachteten Effekten von SSR504734 beitragen könnte.

Zusammenfassend bilden die in dieser Doktorarbeit präsentierten Untersuchungen einen klaren Hinweis dafür, dass Inhibition von GlyT1 zu gewissen Formen von kognitiver Verbesserung führen kann; aber auch, dass das Auftreten dieser Effekte zu einem Grossteil davon abhängig ist, ob die GlyT1-Deletion Neuronen-spezifisch ist oder alle Zelltypen des Vorderhirns umfasst. Die Effekte einer Deletion auf neuronaler Ebene des Vorderhirns gehen über eine blosser Verbesserung der Erinnerung an vergangene Ereignisse hinaus, vielmehr finden sie im Zusammenspiel mit anhaltendem, zielorientiertem Verhalten statt. Das wiederum unterstützt den Vorschlag, dass eine Inhibition des GlyT1 eine mögliche, vielversprechende Strategie darstellen könnte, um kognitives Verhalten zu modulieren, was mögliche Anwendungen in der Behandlung kognitiver Beeinträchtigungen in einer

Vielzahl von Krankheiten mit einschliesst. Ebenso könnte mit einem solchen Ansatz die Verbesserung mentaler Funktionen in gesunden Individuen oder das Aufhalten des kognitiven Zerfalls im Rahmen der normalen Alterung anvisiert werden.

Andererseits kann die beobachtete Abschwächung des PPI-Effekts sowie die Verstärkung der Wirkung von Dopamin-Agonisten in Mäusen mit Neuron-spezifischer Deletion des GlyT1 im Vorderhirn als Zeichen pro-psychotischer Eigenschaften gewertet werden, was allerdings im Widerspruch zum antipsychotischen Profil einer GlyT1-Inhibition steht, welche in anderen Tests gezeigt werden konnte. Dies zeigt allerdings auch, dass jede Veränderung im kognitiven Verhalten sowohl vorteilhafte als auch nachteilige Folgen haben kann, inklusiver möglicher Interaktionen, da die Verbesserung der einen Funktion zur Störung einer anderen Funktion führen kann. Der Gewinn und die Kosten einer solchen Manipulation hängen von der gegebenen Situation ab, und ihr Verhältnis zueinander muss empirischen Tests unterworfen werden.

Die genauen Mechanismen, durch welche die oben beschriebenen Effekte im Hinblick auf einzelne Verschaltungen im Gehirn entstehen, sind immer noch weitgehend unbekannt. Es ist deshalb nötig, die Selektivität der GlyT1 Deletion weiter zu verfeinern, um in diesem Bereich weitere Fortschritte zu erzielen.

REFERENCES

- Bangasser, D. A., Waxler, D. E., Santollo, J., & Shors, T. J. (2006). Trace
- Braff DL, Geyer MA (1990) Sensorimotor gating and schizophrenia. Human and animal model studies. *Arch Gen Psychiatry* 47(2):181-188.
- Cubelos B, Gimenez C, Zafra F (2005) Localization of the GLYT1 glycine transporter at glutamatergic synapses in the rat brain. *Cereb Cortex* 15:448-459.
- Depoortère, R., Dargazanli, G., Estenne-Bouhtou, G., Coste, A., Lanneau, C., Desvignes, C., Poncelet, M., Heulme, M., Santucci, V., Decobert, M., Cudennec, A., Voltz, C., Boulay, D., Terranova, J.P., Stemmelin, J., Roger, P., Marabout, B., Sevrin, M., Vigé, X., Biton, B., Steinberg, R., Françon, D., Alonso, R., Avenet, P., Oury-Donat, F., Perrault, G., Griebel, G., George, P., Soubrié, P., and Scatton, B. 2005. Neurochemical, electrophysiological and pharmacological profiles of the selective inhibitor of the glycine transporter-1 SSR504734, a potential new type of antipsychotic. *Neuropsychopharmacology* 30: 1963-1985
- Gomez J, Hulsmann S, Ohno K, Eulenburg V, Szoke K, Richter D, Betz H (2003) Inactivation of the glycine transporter 1 gene discloses vital role of glial glycine uptake in glycinergic inhibition. *Neuron* 40:785-796.
- Javitt DC (2007) Glutamate and Schizophrenia: Phencyclidine, N-Methyl-d-Aspartate Receptors, and Dopamine-Glutamate Interactions. *Int Rev Neurobiol.*;78:69-108
- Journal of Neuroscience*, 26, 8702-8706.
- McBain CJ, and Mayer ML (1994) N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. *Physiol Rev* 74:723-760.