

## V. SUMMARY

The interplay of neurons and glia cells is highly relevant for many aspects of nervous system development. One important phase is the formation of synapses. Previous studies had shown that soluble glia-derived factors enhance the formation and efficacy of synapses in cultured retinal ganglion cells (RGCs) (Nägler et al., 2001), and identified one of these factors as cholesterol (Mauch et al., 2001). The aim of my project was to investigate how cholesterol supports synapse formation and function and whether other glia derived factors are involved in synaptogenesis in cultured RGCs. In the second part, I was searching for neuronal target genes involved in glia-dependent postnatal differentiation of rat RGCs using GeneChip expression analysis.

Searching for the mechanism of glia- and cholesterol-induced synapse formation, I could show by immunostaining with pre- and postsynaptic markers that glia conditioned medium (GCM) and cholesterol enhanced the number of synapses slowly within several days of treatment. Cholesterol induced a smaller but significant increase in synapse number than GCM. Filipin staining, an indicator of the cholesterol content, revealed a ten-fold enhancement in neuritic cholesterol content within 72 hours of GCM and cholesterol treatment but with a strikingly different time course. This indicated that the increase in cholesterol content does not determine the rate of synaptogenesis. Immunostaining of dendrites using a MAP2 antibody revealed that GCM and cholesterol induced dendrite differentiation with a remarkably similar time course as the increase in synapse number. This indicated that dendrite differentiation, which involved a redistribution of MAP2 and GluR2/3 from the somata to dendrites, was the rate limiting step in glia-induced synaptogenesis. Interestingly, I also found that neighboring cells impede dendrite differentiation. Cholesterol was indispensable for dendrite differentiation but less efficient than GCM, which may explain the lower number of synapses in cholesterol- compared to GCM-treated RGCs. I found that glia-derived laminin containing the  $\gamma 1$  chain together with cholesterol promoted dendrite differentiation to the same extent then GCM, suggesting that laminin act as dendrite promoting signal for RGCs. Furthermore, using electrophysiological recordings, I showed by removal of GCM and replacement with cholesterol, that cholesterol is essential for continuous synaptogenesis and for the stability of evoked transmitter release.

To detect neuronal genes whose expression is regulated by glia, I performed GeneChip analysis of GCM- and cholesterol-treated RGCs. My experiments revealed several genes whose level of expression changed under the influence of GCM and cholesterol.

Interestingly, there was very little overlap between the two groups except for genes involved in cholesterol biosynthesis and homeostasis. To test if the neuronal cholesterol synthesis was influenced by these changes I labeled new synthesized lipids, using a radioactive precursor. I observed that GCM and cholesterol treatment clearly down regulated the cholesterol synthesis in neurons, confirming this expression result. GCM highly up regulated the genes of matrix Gla protein and heme oxygenase 1, which could be confirmed on protein level. Immunostaining revealed that both proteins were located in the somatodendritic compartment.

Together, these results revealed new roles of cholesterol and laminin in neuronal differentiation and underline the importance of neuron-glia interactions during brain development.

## ZUSAMMENFASSUNG

Für viele Prozesse bei der Entwicklung des Nervensystems ist die Interaktion von Neuronen und Gliazellen wichtig. Eine entscheidende Phase dabei ist die Bildung von Synapsen. Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass von Gliazellen sezernierte Faktoren die Bildung und Effizienz von Synapsen in kultivierten retinalen Ganglienzellen (RGZ) erhöhen (Nägler et al., 2001). Einer dieser Faktoren wurde als Cholesterin identifiziert (Mauch et al., 2001). Ziel des ersten Teils meiner Arbeit war es, herauszufinden wie Cholesterin die Synapsenbildung in Kulturen von gereinigten RGZ unterstützt und ob weitere gliale Faktoren dabei involviert sind. Der zweite Teil meiner Arbeit diente der Identifizierung von neuronalen Genen, die bei der postnatalen Differenzierung von RGZ eine Rolle spielen und deren Expression durch Gliazellen beeinflusst wird.

Zur Untersuchung der Mechanismen der glia- und cholesterininduzierten Synapsenbildung führte ich zuerst Immunfärbungen mit pre- und postsynaptischen Markern durch. Ich konnte zeigen, dass Glia-konditioniertes Medium (GKM) und Cholesterin die Anzahl der Synapsen innerhalb von mehreren Tagen langsam erhöhen. Die Behandlung mit Cholesterin erzeugte eine signifikante Erhöhung der Synapsenzahl, die jedoch geringer ausfiel als bei GKM-behandelten Zellen. Anschließende Filipin-Färbungen, ein Indikator für den Cholesteringehalt, ergaben nach 72 Stunden GKM- oder Cholesterinbehandlung einen zehnfachen Cholesterinanstieg in RGZ Neuriten. Dieser wurde jedoch über einen deutlich verschiedenen Zeitverlauf erreicht, was den Anstieg des zellulären Cholesteringehalts als Ursache für die verzögerte Synapsenbildung ausschloss. Die Immunfärbung von Dendriten mit einem Antikörper gegen Map2 ergab, dass GKM und Cholesterin die Differenzierung von Dendriten auslösen, und zwar mit genau derselben zeitlichen Verzögerung wie bei der Synapsenbildung. Dieser Umstand zeigte, dass die Differenzierung von Dendriten die gliainduzierte Synapsenbildung verzögerte und ging einher mit der Umverteilung von Map2 und GluR2/3 vom Soma zu den Dendriten. Weitergehende Untersuchungen ergaben, dass Nachbarzellen die Dendritendifferenzierung behindern. Cholesterin war unentbehrlich für die Dendritendifferenzierung, aber von geringerer Wirkung als GKM, was die kleinere Anzahl der Synapsen bei Cholesterinbehandlung im Vergleich zur GKM-Behandlung erklären könnte. Weitere Untersuchungen ergaben, dass Laminin, welches in GKM enthalten ist, über seine  $\gamma 1$  Untereinheit die Dendritendifferenzierung unterstützte und zusammen mit Cholesterin dieselbe Wirkung erzielte wie GKM. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Laminin bei RGZ als Signal für die

Dendritendifferenzierung wirkt. Mit Hilfe von elektrophysiologischen Messungen und der Wegnahme von GKM sowie dessen Ersatz durch Cholesterin, konnte ich zeigen das Cholesterin essentiell ist für die Fortdauer der Synapsenbildung und die Stabilität von evozierter Transmitter-Ausschüttung.

Um neuronale Gene, deren Expression durch Gliazellen reguliert wird, zu identifizieren, verglich ich die Expressionsmuster von unbehandelten RGZ mit denen von GKM- oder cholesterinbehandelten. Hierfür benutzte ich GeneChips. Diese Untersuchungen ergaben mehrere Gene, deren Expression sich unter dem Einfluss von GKM oder Cholesterin änderte. Interessanterweise gab es nur wenige Überschneidungen zwischen den beiden Gruppen, mit Ausnahme von Genen die Funktionen in der Cholesterinsynthese und Homeostase ausüben. Um zu untersuchen, ob die Veränderung der Genexpression die neuronale Cholesterinsynthese beeinflusst, markierte ich neu synthetisierte Lipide mit Hilfe eines radioaktiven Vorläufers. Die Ergebnisse bestätigten die Expressionsanalyse und zeigten, dass GKM und Cholesterin die Cholesterinsynthese in RGZ deutlich verringerten. Weiterhin ergab die Behandlung mit GKM eine Erhöhung der Expression des Matrix Gla Proteins und der Heme Oxygenase 1, was auf Proteinebene bestätigt wurde. Immunfärbungen lokalisierten beide Proteine in Somata und Dendriten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten neue Funktionen für Cholesterin und Laminin bei der neuronalen Differenzierung auf und lieferten weitere Beweise für die Bedeutung der Interaktionen zwischen Neuronen und Gliazellen während der Entwicklung des Nervensystems.

## RÉSUMÉ

Les interactions entre neurones et cellules gliales jouent un rôle essentiel au cours des diverses phases du développement du système nerveux et en particulier lors de la formation des synapses. Des études réalisées à partir de cultures pures de cellules ganglionnaires rétiniennes (CGR) ont pu ainsi établir que des facteurs gliaux solubles augmentent, pour ces neurones, le nombre de synapses et leur efficacité fonctionnelle (Nägler et al., 2001). De plus, elles ont permis d'identifier le cholestérol comme l'un de ces facteurs dérivé des glies (Mauch et al., 2001). Notre travail a eu pour but de déterminer d'une part comment le cholestérol peut induire la formation de synapses et accroître leur efficacité et d'identifier d'autres facteurs gliaux potentiellement impliqués dans la synaptogénèse des CGR. D'autre part, nous avons recherché par l'utilisation de GeneChips, les gènes cibles impliqués dans la différenciation post-natale des CGR de rat et dont l'expression est influencée par les facteurs dérivées des glies. Nos travaux sur les mécanismes mis en œuvre lors de la synaptogénèse ont permis de montrer, par immunomarquage des structures pré et post-synaptiques, que le milieu conditionné de glie (MCG) ainsi que le cholestérol induisent une augmentation lente et progressive du nombre des synapses au cours de la durée du traitement. Pour le cholestérol, cette augmentation est plus faible quoique significative par rapport au traitement par le MCG. Après un traitement de 72 heures par le MCG ou le cholestérol, un marquage à la filipine permet la visualisation du cholestérol intracellulaire et montre une augmentation d'un facteur dix de la teneur en cholestérol des neurites. Cependant, il faut remarquer que la cinétique d'augmentation observée est très différente dans les deux cas. Ces résultats semblent indiquer que l'augmentation de la teneur interne en cholestérol ne détermine pas le taux de synaptogénèse. L'immunomarquage des dendrites à l'aide de l'anticorps MAP2 nous a permis d'établir que le MCG et le cholestérol induisent une différenciation dendritique selon une cinétique similaire à celle de l'augmentation du nombre de synapses. Ceci indique que la différenciation dendritique, impliquant une redistribution de MAP2 et du récepteur GluR2/3 du corps cellulaire vers les dendrites, constitue donc l'étape limitante du taux de synaptogénèse induite par la glie. Nous avons pu aussi montrer que la présence de cellules voisines limite la différenciation dendritique. Le cholestérol est indispensable pour la différenciation dendritique mais s'avère moins efficace que le MCG : ce résultat pourrait expliquer le plus faible nombre de synapses obtenues avec les CGR traitées avec le cholestérol comparativement à celles traitées avec le MCG. Nous avons pu établir que la

laminine dérivée des glies, contenant la chaîne  $\gamma 1$ , induit une différenciation dendritique comparable à celle obtenue à l'aide du MCG lorsqu'elle est associée au cholestérol: ce résultat suggère que la laminine constituerait un signal d'induction dendritique chez les CGR. De plus la mesure de l'activité électrophysiologique nous a permis de montrer, en remplaçant le MCG par le cholestérol, que ce dernier est essentiel pour maintenir la synaptogénèse et la libération des neurotransmetteurs dans la réponse évoquée.

Afin d'isoler les gènes dont l'expression serait régulée par les facteurs gliaux, nous avons réalisé des analyses par GeneChips de CGR traitées au MCG et au cholestérol. Ce travail a permis de mettre en évidence plusieurs gènes dont l'expression est ainsi modifiée par le MCG ou par le cholestérol. De façon surprenante très peu de gènes candidats se retrouvent à la fois dans les deux conditions de traitement, à l'exception des gènes impliqués dans la biosynthèse et l'homéostasie du cholestérol. Afin de déterminer si la biosynthèse neuronale du cholestérol était influencée par les modifications dans l'expression de ces gènes, nous avons marqué à l'aide de précurseurs radioactifs les lipides nouvellement synthétisés. Nous avons ainsi pu établir que le traitement au MCG comme au cholestérol diminue effectivement la synthèse du cholestérol dans les neurones, confirmant donc le travail portant sur l'expression des gènes neuronaux. Enfin le MCG accroît fortement l'expression des gènes codant pour l'expression de la protéine de la matrice Gla et l'hème oxygénase 1. Ce résultat a pu être confirmé au niveau de l'expression protéique: les marquages immunocytologiques ont en effet montré que ces deux protéines sont localisées dans le compartiment somatodendritique des CGR.

L'ensemble de notre travail révèle les rôles nouveaux que joueraient le cholestérol et la laminine au cours de la différenciation neuronale et souligne l'importance des interactions neurone-glie au cours du développement du système nerveux.