

The effects of phosphodiesterase inhibition on memory

Citation for published version (APA):

Rutten, K. (2007). *The effects of phosphodiesterase inhibition on memory*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20070530kr>

Document status and date:

Published: 01/01/2007

DOI:

[10.26481/dis.20070530kr](https://doi.org/10.26481/dis.20070530kr)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

This thesis describes studies investigating the effects of phosphodiesterase (PDE) inhibitors on learning and memory. During the last decennia, our understanding of the neurobiological processes underlying learning and memory has continuously improved, leading to the identification of targets for the development of memory-enhancing drugs. PDEs are enzymes that hydrolyze cyclic AMP (cAMP) and cyclic GMP (cGMP) in the body and the brain. Recently, evidence has been accumulating that these second messenger molecules cGMP and cAMP are very important in learning and memory processes. This thesis adds to the growing public interest into the effects of PDE- on cognition. The studies described in thesis show memory enhancing properties of different PDE-Is in different animal species and in different behavioral tests and models.

Chapter 1: An introduction is provided into the basics of the human memory system, animal models of learning and memory and possible underlying pathways that involve long term potentiation (LTP). Furthermore, an overview is given of the different PDEs that are known at present and we focus on three PDEs which have been identified as possible relevant targets for memory improvement: PDE2, PDE4 and PDE5. Finally, an extensive review of the literature on PDE-I and putative memory enhancement in behavioral models is presented.

Chapter 2: The effects of the *in vivo* application of the PDE5-I sildenafil on object recognition memory are described in relation to its administration *in vitro* using hippocampal slices in Swiss mice. To investigate a possible presynaptic underlying mechanism of action for PDE5-I we tried to co-localize cGMP immunoreactivity (cGMP-IR) with the pre-synaptic marker synaptophysin. Sildenafil improved memory performance in the ORT and cGMP-IR was increased in varicosities and some fibers in the CA1 area of the hippocampus. Furthermore, failed co-localization of cGMP with synaptophysin implies that either cGMP is not elevated at the presynaptic level (and thus does not work via a presynaptic mechanism of action), or that our mechanisms for measuring cGMP-IR are not sensitive enough to pick up small fluctuations in cGMP

concentrations. Future studies with specific PDE5 antibodies will further elucidate these results.

Chapter 3: The effect of the selective PDE4-I rolipram on memory performance in rats was investigated using the object recognition task. Since, previous studies showed that intra-hippocampal injections of 8Br-cAMP enhanced long-term memory only when administered 3h after training, we wanted to investigate the time dependent administration of rolipram on long-term memory. Furthermore we investigated the effects of rolipram in a short-term memory deficit model, i.e. the scopolamine model in 1h interval ORT. Using a 24 h interval in the ORT, rolipram showed an improvement in long-term memory performance only when injected 3 h after training, not when injected 30 min before or immediately after training. Furthermore, rolipram reversed the scopolamine-induced short-term memory deficit. Although the improved memory performance in both conditions is likely to be explained by elevated cAMP levels, two separate working mechanisms might explain these effects.

Chapter 4: The time-dependent memory enhancing properties of three selective PDE-Is vardenafil (PDE5-I), rolipram (PDE4-I) and BAY 60-7550 (PDE2-I) were investigated in the ORT. In particular, the time-dependent involvement of cAMP and cGMP in memory consolidation was assessed by altering the time points of drug administration. Vardenafil, rolipram, and BAY 60-7550 were tested in rats with a 24 h delay interval in the ORT. The PDE-Is were administered at different time points, i.e. directly after, 1 h, 3 h and 6 h after T1. Vardenafil only showed an effect on object memory when injected directly after T1, rolipram only showed an improvement when injected 3 h after T1 and BAY 60-7550 improved memory when injected either directly after or 3 h after. No treatment effects were found at the 1 h or 6 h administration time points. These results suggest that different types of PDE-Is can affect different stages of memory consolidation. Moreover, time dependent administration of three different PDE-Is advocates specific roles of cAMP and cGMP in the long term memory consolidation processes.

Chapter 5: Previous studies showed that rolipram can reverse the cholinergic deficit caused by scopolamine. However underlying mechanisms of action remain obscure. This study investigated the effect of rolipram in a serotonergic memory deficit model of acute tryptophan depletion (ATD). First, the effects different treatment times of ATD on plasma tryptophan (TRP) values and ORT performance were investigated. ATD significantly lowered the plasma TRP ratio ($\text{TRP}/\Sigma\text{LNAA}$) to a maximum of 48%, approximately 1 h after administration. Furthermore ATD impaired ORT performance when administered 3 h before testing. Rolipram (0.1 mg/kg) reversed the ATD induced serotonergic deficit. Possible mechanisms of action act through elevation of cAMP levels and downstream up-regulations of neurotransmitter systems.

Chapter 6: Currently, four isoforms of the PDE4 enzyme (A, B, C and D) have been identified, yet the requisite involvement of each of these isoforms in mediating LTM has yet to be elucidated. The intent of the present study was to use genetic knock-out (KO) mice to investigate the involvement of two of the PDE4 isoforms that have high brain expression, namely D and B, in *in vivo* models of learning and memory. Adult, male PDE4-D and PDE4-B KO mice were first characterized in an associative learning paradigm using the fear conditioning model (FC) at two time points, 24 h for long term memory (LTM), and 1 h for short term memory (STM). Interestingly, whereas the PDE4 B KO mice demonstrated equivalent LTM and STM as compared to wild-type mice, the PDE4-D KO animals exhibited significant deficits in LTM as compared with their control littermates. Neither the PDE4-B or PDE4-D mice showed any alterations in Morris water maze (MWM) performance (acquisition or retention) as compared to wild-type controls. Whereas the deficit in LTM observed in the PDE4-D KO mice was not expected, and may be explained by adaptive responses occurring because of constitutive inactivity of this isoform throughout development, it does suggest that the PDE4-D isoform, possibly more so than PDE4-B may be of importance in learning and memory.

Chapter 7: Selective PDE-Is have been shown to improve long-term memory in several rodent models of cognition. However, studies evaluating the effects of PDE-I on cognition in unimpaired primates are very scarce. This study investigated the effect of the

PDE4-I rolipram and the PDE5-I sildenafil on object retrieval (OR) performance. OR is a prefrontal cortical mediated task, which is likely to capture attention and response inhibition. Young adult male *Cynomolgus* macaques were trained in the OR task. Both rolipram and sildenafil significantly improved performance in the OR task. These findings complement and extend to the cognition-enhancing effects of cAMP and cGMP via PDE-I. However, the underlying mechanism of action and cellular pathways remain elusive.

Chapter 8: In the final chapter a general discussion of the findings in this thesis. Taken together, the results presented in the present thesis show convincing cognitive enhancing properties of PDE-Is. The enhancing effects of PDE-I on memory performance have been shown in rats, mice and primates. Evidence suggests differential time-dependent effects of cGMP or cAMP selective PDEs. It appears that cGMP is mainly involved in early consolidation processes and cAMP in late consolidation processes. The underlying pathways are yet to be fully explained, although cellular processes that are related to LTP seem to be a possible mechanism. The cGMP/PKG/CREB pathway for early consolidation processes and the cAMP/PKA/CREB pathway for late consolidation processes might be the most probable mechanisms underlying the observed behavioral effects. In addition, the pre-synaptic NO/sGC/cGMP pathway may also exert effects on short-term memory, but this has not yet been investigated at present. Furthermore, cAMP may also be involved in short-term memory processes through enhanced neurotransmitter release. Finally, the understanding of the underlying mechanisms of PDE-Is and cognition can be further complicated, since evidence has shown that E-LTP can be converted to L-LTP. Future studies with specific antibodies for PDEs have to elucidate the pre or postsynaptic localization of PDEs and could further illuminate the underlying mechanisms of action. Recently our lab has developed a specific PDE5 antibody and the first immunohistochemical are expected in due course.

PDE-Is, in particular PDE5-Is, are known to have peripheral effects on vasodilatation. It has not yet been fully determined whether PDE-Is may also have central effects on blood flow and glucose metabolism. In this chapter we discussed why based on the literature it

is not very likely that our memory enhancing effects of PDE-I are explained by central vascular effects.

Isoform specific studies are promising new ways to further investigate the underlying mechanisms of cognition enhancement in animal models. Genetic KO models for PDE4 show behavioral differences in cognition and depression, but developmental deficits in these animals might confound the outcome of these studies. Novel techniques, such as gene silencing, could further increase our understanding of the role of PDE (isoform) enzymes in cognition and might provide more selective targets for cognitive enhancement.

Samenvatting

De studies die beschreven worden in dit proefschrift tonen de effecten van phosphodiesterase (PDE) remmers op leren en het geheugen. De afgelopen jaren is onze kennis van de onderliggende processen van leren en het geheugen steeds beter geworden. Dit heeft geleid tot de identificatie van mogelijke targets voor de ontwikkeling van geheugenverbeterende medicijnen. PDEs zijn enzymen die in ons lichaam en in het brein cyclisch AMP (cAMP) en cyclisch GMP (cGMP) hydrolyseren. Steeds meer bewijs toont aan dat deze secundaire ‘messenger’ moleculen cAMP en cGMP een belangrijke rol spelen in geheugenprocessen. Dit proefschrift draagt bij aan de groeiende interesse in PDE remmers en cognitie. De in dit proefschrift beschreven experimenten tonen geheugen verbeterende effecten van PDE remmers in verschillende diersoorten en in verschillende gedragstaken en modellen.

Hoofdstuk 1: Er wordt een introductie gegeven van de basale opbouw van het menselijke geheugen systeem, dierexperimentele modellen voor leren en geheugen en de mogelijke onderliggende mechanismen, waaronder long term potentiatie (LTP). Verder wordt een overzicht gegeven van de op dit moment bekende PDEs en we gaan dieper in op drie PDEs die gekenmerkt zijn als mogelijke targets voor geheugenverbetering: PDE2, PDE4 en PDE5. Ten slotte wordt een uitgebreid overzicht van de literatuur over PDE remmers en mogelijke geheugenverbeterende effecten in diermodellen gegeven.

Hoofdstuk 2: De effecten van *in vivo* toediening van de PDE5 remmer sildenafil op het geheugen in de objectherkenningstaak (ORT) worden onderzocht in relatie tot de *in vitro* toediening op hippocampale coupes van Swiss muizen. Om een mogelijk presynaptisch onderliggend werkingsmechanisme van PDE5 remmers te onderzoeken werd geprobeerd om immunoreactiviteit van cGMP (cGMP-IR) te co-localiseren met de presynaptische marker synaptophysine. Sildenafil verbeterde het ORT geheugen in muizen en cGMP-IR werd waargenomen in varicositeiten en enkele vezels van het CA1 gebied van de hippocampus. Er werd verder geen co-localisatie gevonden tussen cGMP-IR en

synaptophysine. Dit kan betekenen dat cGMP niet verhoogd actief is in presynaptische gebieden (en het dus niet via een presynaptisch mechanisme werkt), of dat onze meettechnieken niet gevoelig genoeg zijn om kleine cGMP fluctuaties op te pikken.

Hoofdstuk 3: De effecten van de selectieve PDE4 remmer rolipram op het geheugen van ratten werden onderzocht in de ORT. Omdat eerdere studies lieten zien dat intra-hippocampale injecties van 8Br-cAMP het lange termijn geheugen alleen verbeterden wanneer de injecties 3 uur na training plaatsvonden, wilden we de effecten van tijd van toediening van rolipram op het lange termijn geheugen onderzoeken. Daarnaast werden de effecten van rolipram onderzocht in een model voor korte termijn geheugen, namelijk het scopolamine model met 1 uur interval in de ORT. Bij een 24 uur interval in de ORT verbeterde rolipram het lange termijn geheugen alleen wanneer het 3 uur na de training werd toegediend en niet wanneer het een half uur voor of direct na de training werd toegediend. Verder hief rolipram het korte termijn geheugen defect door scopolamine op. De gevonden geheugenverbeteringen van rolipram in beide condities worden waarschijnlijk veroorzaakt door verhoging van de cAMP concentraties, maar wij denken dat verschillende werkingsmechanismen deze effecten verklaren.

Hoofdstuk 4: De geheugenverbeterende effecten en de tijd van toediening van drie selectieve PDE remmers: vardenafil (PDE5 remmer), rolipram (PDE4 remmer) en BAY 60-7550 (PDE2 remmer) werden onderzocht in de ORT. De tijdsafhankelijke betrokkenheid van cAMP en cGMP bij de consolidatie van het geheugen werd onderzocht door de tijd van toediening te variëren. Vardenafil, rolipram en BAY 60-7550 werden in ratten getest met een 24 uur interval ORT. De PDE remmers werden op verschillende tijdstippen toegediend, namelijk: direct na, 1 uur, 3 uur of 6 uur na trial 1 (T1). Vardenafil verbeterde alleen het geheugen wanneer het direct na T1 werd toegediend, rolipram werkte alleen wanneer het 3 uur na T1 werd toegediend en BAY 60-7550 verbeterde het geheugen wanneer het of direct, of 3 uur na T1 werd toegediend. Geen effecten werden gevonden wanneer de drugs 1 uur of 6 uur na T1 werden toegediend. Deze resultaten suggereren dat verschillende PDE remmers verschillende fases van consolidatie processen beïnvloeden. Met andere woorden, de tijdsafhankelijke

toediening van drie verschillende PDE remmers pleit voor specifieke betrokkenheid van cAMP en/of cGMP in consolidatie processen van het lange termijn geheugen.

Hoofdstuk 5: Eerder onderzoek toonde aan dat rolipram het cholinerge defect dat door scopolamine wordt veroorzaakt kan opheffen. Maar de onderliggende mechanismen zijn nog niet volledig bekend. In deze studie werden de effecten van rolipram onderzocht in een serotonerg defect model, namelijk dat van acute tryptofaan depletie (ATD).

Allereerst werden de effecten van verschillende toedieningstijden van het ATD mengsel op de ORT prestatie en de tryptofaan (TRP) waarden in het bloedplasma bepaald. ATD zorgde voor een significante verlaging van de TRP ratio (TRP/ Σ LNAAs) in het bloed tot maximaal 48%, ongeveer 1 uur na de toediening. Daarnaast verslechterde ATD de geheugenprestatie in de ORT wanneer het mengsel 3 uur voor de training werd toegediend. Rolipram was in staat het serotonerge geheugendefect op te heffen. Een mogelijke verklaring voor deze effecten is dat PDE4 remming via een verhoging van cAMP niveaus, de activiteit van diverse neurotransmitter systemen versterkt.

Hoofdstuk 6: Tot heden zijn er vier isovormen van het PDE4 enzym bekend (A, B, C en D) maar de respectievelijke betrokkenheid van elk van deze isovormen in de vorming van lange termijn geheugen moeten nog onderzocht worden. Het doel van deze studie was om de betrokkenheid te bestuderen van twee PDE4 isovormen die veel in het brein voorkomen, namelijk D en B, in *in vivo* modellen voor leren en geheugen. Hierbij werd gebruik gemaakt van genetische knock-out (KO) muizen. Volwassen mannelijke PDE4-D en PDE4-B KO muizen werden eerst gekarakteriseerd in een associatieve leertaak. Hierbij werd gebruik gemaakt van de fear conditioning (FC) test voor lange termijn geheugen (24 uur interval) en korte termijn geheugen (1 uur interval). De PDE4-B dieren toonden geen verschillen tussen KOs en wild-type muizen op korte en lange termijn geheugen. De PDE4-D KO muizen toonden echter wel een significante verslechtering in lange termijn geheugen in vergelijking met de controle wild-type muizen. Zowel de PDE4-D als de PDE4-B KO muizen lieten geen verschillen zien in de spatiële Morris water maze (MWM) test (acquisitie en retentie) ten opzichte van de wild-types. Hoewel de verslechtering bij de PDE4-D muizen onverwacht was en mogelijk verklaard kan

worden door aanpassingsreacties die optreden door de constante inactiviteit van deze isovorm tijdens de ontwikkeling, suggereert dit wel dat de PDE4-D isovorm misschien nog wel meer dan de PDE4-B isovorm belangrijk kan zijn in leren en geheugen.

Hoofdstuk 7: In diverse knaagdier modellen voor leren en geheugen is aangetoond dat selectieve PDE remmers het lange termijn geheugen verbeteren. Er zijn echter maar zeer weinig studies waarin de effecten van PDE remmers op cognitie in gezonde primaten werd onderzocht. Dit hoofdstuk beschrijft de effecten van de PDE4 remmer rolipram en de PDE5 remmer sildenafil op 'object retrieval' (OR) prestatie. De OR taak is een taak die aangestuurd wordt door de prefrontale cortex en processen als aandacht en respons inhibitie worden ermee gemeten. Jonge volwassen *Cynomolgus* makaken werden getraind in de OR taak. Zowel rolipram als sildenafil verbeterden de prestatie in de OR test. Deze bevindingen versterken en vergroten het bewijs voor de cognitieverbeterende effecten van cAMP en cGMP via remming van PDEs. Hoewel de taakverbetering evident was kunnen we geen eenduidig onderliggende werkingsmechanismen en cellulaire paden aanduiden.

Hoofdstuk 8: In dit hoofdstuk worden de bevindingen van dit proefschrift bediscussieerd. Al met al geven de resultaten van de experimenten uit dit proefschrift overtuigend bewijs van de cognitie verbeterende eigenschappen van PDE remmers. De geheugenverbeterende effecten van PDE remmers werden aangetoond in ratten muizen en primaten. Er is bewijs dat er verschillende tijdsafhankelijke effecten van cAMP of cGMP selectieve PDEs zijn. Het lijkt zo te zijn dat cGMP met name betrokken is in vroege consolidatieprocessen en dat cAMP met name de in late consolidatieprocessen betrokken is. De onderliggende mechanismen moeten nog volledig verklaard worden, maar cellulaire processen die in verband staan met LTP zijn een voor de hand liggende en plausibele mogelijkheid. Het cGMP/PKG/CREB proces voor vroege consolidatie processen en het cAMP/PKA/CREB proces voor late consolidatie processen zijn wellicht de meest waarschijnlijke mechanismen die ten grondslag kunnen liggen aan de gevonden geheugen verbeteringen. Verder zou het presynaptische NO/sGC/cGMP proces ook effecten kunnen hebben op het korte termijn geheugen, maar dat is tot heden nog niet

onderzocht. Daarnaast kan cAMP ook betrokken zijn in korte termijn geheugen processen, waarschijnlijk via verhoging van neurotransmitter afgifte. Ten slotte wordt het ontrafelen van de onderliggende mechanismen van PDE remming nog moeilijker omdat is aangetoond dat E-LTP kan worden omgezet in L-LTP. In de toekomst zullen experimenten met specifieke antilichamen tegen PDEs uitsluitend moeten geven over de pre- of postsynaptische localisatie van de PDEs en dit zou meer inzicht in de onderliggende werkingsmechanismen kunnen bieden. Recentelijk is in ons lab een specifiek PDE5 antilichaam ontwikkeld en de eerste immunohistochemische resultaten worden in de nabije toekomst verwacht.

PDE remmers, PDE5 remmers in het bijzonder, staan bekend om hun perifere effecten op vaatverwijding. Het is nog niet onomstotelijk aangetoond dat PDE remmers ook effecten hebben op de centrale doorbloeding en het centrale glucose metabolisme. In dit hoofdstuk wordt bediscussieerd waarom het op basis van de literatuur niet waarschijnlijk is dat onze geheugenverbeterende effecten van PDE remmers verklaard zouden kunnen worden door effecten op de doorbloeding.

Isovorm specifieke studies zijn veelbelovende nieuwe manieren om de onderliggende mechanismen van geheugenverbetering in diermodellen te onderzoeken. Genetische KO modellen voor PDE4 laten veranderingen in cognitie en depressie zien maar ontwikkelingsafwijkingen zouden de resultaten van deze experimenten kunnen vertroebelen. Nieuwe technieken zoals 'gen-silencing', zouden ons begrip van de onderliggende mechanismen van PDE remming en cognitie aanzienlijk kunnen verbeteren en kunnen leiden tot meer specifieke targets voor cognitieve verbetering.