

# **Pharmakologische und nicht-pharmakologische Effekte auf die Kognition**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Charlotte Both**

aus Köln

Düsseldorf, Dezember 2013

aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Georg Kojda  
Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Peter Proksch

Tag der mündlichen Prüfung: 31.1.14

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>6</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>9</b>
1.1. Zentrale cholinerge Systeme und Kognition .....	9
1.1.1. Neuronale nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR) .....	11
1.1.1.1. Struktur und Funktion von neuronalen nAChR.....	11
1.1.2. Cholinerge Systeme und <i>Morbus Alzheimer</i> .....	14
1.1.2.1. Pathogenese von <i>Morbus Alzheimer</i> : zugrunde liegende Mechanismen und die Rolle von nAChR .....	15
1.1.3. Aspekte der nAChR-Modulation .....	18
1.1.3.1. nAChR und Nikotinabhängigkeit .....	18
1.1.3.2. nAChR-Modulatoren zur Behandlung der Nikotinabhängigkeit .....	20
1.1.3.2.1. Vareniclin.....	21
1.2. Körperliches Training und Kognition.....	23
1.2.1. Untersuchungen am Menschen .....	24
1.2.2. Tierexperimentelle Untersuchungen .....	27
1.2.2.1. Zugrunde liegende molekulare und zelluläre Trainingseffekte.....	28
1.2.3. BDNF und seine Regulation .....	29
1.2.4. Interaktion des neuronalen und vaskulären Systems .....	31
1.3. Fragestellungen .....	33
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>34</b>
2.1. Puffer und Lösungen.....	34
2.2. Versuchstiere .....	36
2.2.1. Fütterungsversuche .....	36
2.2.2. Injektionsversuche.....	37
2.2.3. Trainingsversuche .....	37
2.2.4. Transgene Tiere und deren Genotypisierung .....	39
2.2.4.1. Isolierung von genomischer DNA aus Biopsien der Maus .....	39

2.2.4.2. Genotypisierung transgener Mäuse mittels PCR.....	40
2.2.5. Präparation der Tiere und Entnahme der Organe.....	41
2.3. Zellkulturexperimente.....	42
2.3.1. Kultivierung und Inkubationsversuche .....	42
2.4. Präparation und Analyse von Proteinen.....	43
2.4.1. Proteinisolierung aus tierischem Gewebe .....	43
2.4.1.1. Herstellung eines Gewebehomogenats .....	43
2.4.1.2. Isolation der zytosolischen Fraktion.....	44
2.4.2. Proteinisolierung aus endothelialen und neuronalen Zellen .....	44
2.4.2.1. Herstellung eines Gesamtextraktes.....	44
2.4.2.2. Isolierung der membranären Fraktion .....	44
2.4.3. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	45
2.4.4. Western-Blot .....	45
2.4.4.1. Die diskontinuierliche SDS-PAGE .....	45
2.4.4.2. Transfer der Proteine auf die Membran.....	46
2.4.4.3. Blocken unspezifischer Bindungsstellen .....	46
2.4.4.4. Antikörperdetektion.....	46
2.4.4.5. Detektion des BDNF .....	47
2.5. Präparation und Analyse der RNA .....	48
2.5.1. RNA-Isolierung aus tierischem Gewebe.....	48
2.5.2. RNA-Isolierung aus endothelialen und neuronalen Zellen .....	49
2.5.3. RNA-Konzentrationsbestimmung.....	50
2.5.4. cDNA-Synthese.....	50
2.5.5. Realtime-RT-PCR.....	51
2.6. Untersuchungen zur kognitiven Funktion: Objektwiedererkennung.....	53
2.6.1. Versuchstiere und Adaptation .....	56
2.6.2. Apparatur und Objekte .....	56
2.7. Statistik .....	58
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>59</b>
3.1. Effekte von Vareniclin.....	59
3.1.1. Untersuchungen zum Effekt von Vareniclin <i>in vivo</i> .....	59

3.1.1.1. Validierung einer Vareniclin-Trinklösung .....	59
3.1.1.2. Effekt von Vareniclin auf die Regulation des $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptors .....	60
3.1.1.2.1. Effekt einer oralen Vareniclin-Behandlung .....	61
3.1.1.2.1.1. Effekt von Vareniclin auf die Proteinexpression des $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptors .....	61
3.1.1.2.1.2. Effekt von Vareniclin auf die mRNA-Expression des $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptors .....	64
3.1.1.2.2. Effekt einer Vareniclin-Injektion .....	66
3.1.1.2.2.1. Effekt von Vareniclin auf die Proteinexpression des $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptors .....	66
3.1.1.2.2.2. Effekt von Vareniclin auf die mRNA-Expression des $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptors .....	68
3.1.2. Untersuchungen zum Effekt von Vareniclin <i>in vitro</i> .....	70
3.1.2.1. Auswahl einer geeigneten neuronalen Zelllinie .....	70
3.1.2.1.1. Basale Expression der Untereinheiten .....	70
3.1.2.1.2. Stimulation mit Vareniclin für unterschiedliche Zeitintervalle .....	71
3.1.2.2. Effekt von Vareniclin auf die Proteinexpression des neuronalen $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptors .....	73
3.1.2.2.1. Effekt von Vareniclin in der Membran .....	74
3.1.2.2.2. Effekt von Vareniclin im Zytosol .....	76
3.1.2.3. mRNA-Expression des neuronalen $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptors <i>in vitro</i> .....	77
3.1.2.3.1. Basale Expression der Untereinheiten .....	77
3.1.2.3.2. Effekt von Vareniclin auf die mRNA-Expression des $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptors .....	78
3.1.2.4. Effekt von Vareniclin auf cerebrale Endothelzellen .....	79
3.1.2.4.1. Effekt von Vareniclin auf die Proteinexpression des $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptors ..	79
3.1.2.4.2. Effekt von Vareniclin auf die mRNA-Expression des $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptors ..	80
3.1.3. Untersuchungen zur kognitiven Funktion .....	81
3.1.3.1. Etablierung eines Modells zur Testung kognitiver Funktionen .....	81
3.1.3.1.1. Testung der Apparatur und der Objekte .....	82
3.1.3.1.2. Testung der Objektwiedererkennung unter Kontrollbedingungen .....	83
3.1.3.1.3. Testung der Objektwiedererkennung bei Änderungen des Retentionsintervalls .....	84
3.1.3.2. Effekt von Vareniclin auf die Objektwiedererkennung unter Kontrollbedingungen .....	85
3.1.3.2.1. Effekt von Vareniclin auf die Objektwiedererkennung bei Änderungen des Retentionsintervalls .....	87
3.1.3.3. Effekt von Vareniclin auf das räumliche Objektgedächtnis .....	89

3.1.3.3.1. Testung des räumlichen Objektgedächtnisses unter Kontrollbedingungen .....	89
3.1.3.3.2. Effekt von Vareniclin auf das räumliche Objektgedächtnis bei Änderungen des Retentionsintervalls .....	90
3.1.3.4. Effekt von Vareniclin bei Anwendung eines pharmakologisch-induzierten Defizitmodells .....	91
3.1.3.4.1. Testung des pharmakologisch-induzierten Defizitmodells.....	91
3.1.3.4.2. Effekt von Vareniclin auf das Scopolamin-induzierte Defizit bei Objektwiedererkennung.....	92
3.1.3.4.3. Effekte auf die Lokomotion bei Anwendung des pharmakologisch-induzierten Defizitmodells.....	93
3.1.3.4.3.1. Effekt von Vareniclin auf die Lokomotion.....	95
3.2. Effekte von körperlichem Training.....	96
3.2.1. Trainingseffizienz .....	96
3.2.2. Effekt des körperlichen Trainings auf die Proteinexpression .....	97
3.2.2.1. Effekt des körperlichen Trainings auf die Expression der eNOS.....	98
3.2.2.2. Effekt des körperlichen Trainings auf die Expression des $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptors	100
3.2.2.3. Effekt des körperlichen Trainings auf die Expression des BDNF.....	103
3.2.3. Effekt des körperlichen Trainings auf die Objektwiedererkennung .....	104
3.2.4. Effekt des körperlichen Trainings auf das Scopolamin-induzierte Defizit bei Objektwiedererkennung .....	105
3.2.4.1. Effekte auf die Lokomotion bei Anwendung des pharmakologisch-induzierten Defizitmodells .....	106
3.2.5. Effekt des körperlichen Trainings in eNOS <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	108
3.2.5.1. Trainingseffizienz.....	108
3.2.5.2. Effekt des körperlichen Trainings auf die Objektwiedererkennung in eNOS <sup>-/-</sup> -Mäusen .....	109
3.3. Effekte von endogenem NO .....	110
3.3.1. Effekt von endothelialelem NO auf die BDNF-Expression.....	110
3.3.2. Effekt von endothelialelem NO auf die Objektwiedererkennung.....	111
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>113</b>
4.1. Effekte von Vareniclin.....	114
4.1.1. Effekt von Vareniclin auf die nAChR-Regulation <i>in vivo</i> .....	114
4.1.2. Effekt von Vareniclin auf die nAChR-Regulation <i>in vitro</i> .....	117

4.1.3. Effekt von Vareniclin auf die Objektwiedererkennung .....	124
4.1.4. Effekt von Vareniclin auf das räumliche Objektgedächtnis.....	127
4.1.5. Effekt von Vareniclin auf das Scopolamin-induzierte Defizit bei Objektwiedererkennung .....	129
4.1.6. nAchR-Hochregulation als Ursache promnestischer Effekte .....	133
4.2. Effekte von körperlichem Training.....	136
4.2.1. Effekt von körperlichem Training auf die Proteinregulation.....	136
4.2.2. Effekt von körperlichem Training auf die Objektwiedererkennung .....	139
4.3. Effekte von endogenem NO .....	141
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>144</b>
<b>Summary .....</b>	<b>146</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>148</b>
<b>Lebenslauf und Publikationen.....</b>	<b>177</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>179</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Ach	Acetylcholin
AchE	Acetylcholinesterase
AD	Alzheimer-Demenz
ANOVA	Varianzanalyse
APOE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid-Precursor-Protein
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AT1-Rezeptor	Angiotensin-Rezeptor Typ 1
AT2-Rezeptor	Angiotensin-Rezeptor Typ 2
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
bEnd.3	Murine cerebrale Endothelzelllinie
Bp	Basenpaare
BrdU	5-Bromo-2'-Desoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
$\alpha$ Bgtx	$\alpha$ -Bungarotoxin
c	Konzentration
C57BL/6	C57 Black 6 Labormaus
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CBF	cerebraler Blutfluss
CBV	cerebrales Blutvolumen
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CREB	cAMP response element binding protein
Ct	Threshold cycle
d	Tag
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DI	Diskriminationsindex
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotide

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

DA	Dopamin
DTT	Dithiotreitol
ecSOD	extrazelluläre Superoxid-Dismutase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(aminoethylether)-tetraessigsäure
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
eNOS <sup>++</sup>	transgene eNOS-überexprimierende Maus
eNOS <sup>-/-</sup>	transgenes eNOS Knockout-Tier
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	extracellular signal related kinase
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
[ <sup>3</sup> H]	Tritium
HEK	Humane embryonale Nierenzellen
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
HT-22	Murine hippocampale Zelllinie
Hz	Hertz
IGF	Insulin-like growth factor
i.p.	intraperitoneal
K <sub>i</sub>	Affinitätskonstante
kDa	Kilodalton
Lys	Lysin
L-NAME	L-Nitroarginin-Methylester
LTP	Langzeitpotenzierung
mAChR	muskarinischer Acetylcholinrezeptor
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
min	Minute
MMSE	Mini-Mental-Status-Test
MRI	Magnetresonanz-Tomografie
mRNA	messenger RNA
NA	Noradrenalin
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

NGF	Nerve growth factor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NP-40	Igepal
NRT	Nikotinersatzmittel
NT	Neurotrophin
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PET	Positronen-Emissions-Tomografie
PIC	Proteaseinhibitor-Cocktail
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der $\text{H}_3\text{O}^+$ -Konzentration
PIM	Proteaseinhibitor-Mix
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standard error of the mean
SPF	spezifiziert pathogenfrei
SSRI	Selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
TEMED	Tetramethylethylendiamin
$t_{\text{max}}$	Zeit bis zum Auftreten maximaler Plasmakonzentrationen
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TrkB	Tropomyosin-related receptor kinase B
VEGF	Vascular endothelial growth factor
ZNS	Zentrales Nervensystem
×g	-fache Erdbeschleunigung

## 1. Einleitung

### 1.1. Zentrale cholinerge Systeme und Kognition

Extensive Forschung der vergangenen Jahrzehnte demonstrierte die Beteiligung zentraler cholinergischer Systeme in den neuronalen Schaltkreisen für kognitive Prozesse (Fibiger, 1991). Der zentrale Neurotransmitter Acetylcholin stammt dabei aus Neuronen des basalen Vorderhirns, dem Nucleus septi medialis, dem horizontalen und verticalen Band von Broca und dem Nucleus basalis Meynert, die unter anderem den Neocortex und den Hippocampus cholinerg innervieren (Everitt & Robbins, 1997; Schliebs & Arendt, 2011). Schädigung dieser cholinergen Neurone wurde assoziiert mit den pathologischen Veränderungen bei neurodegenerativen Krankheitsbildern, einschließlich *Morbus Alzheimer* (Whitehouse et al., 1982; Cummings & Benson, 1987; Schliebs & Arendt, 2006). Das Interesse an cholinergen Systemen wuchs durch Studienbefunde der 70er Jahre, die den Verlust von cholinergen Markern im cerebralen Cortex bei Patienten mit *Morbus Alzheimer* berichteten und diesen Untergang mit dem Auftreten kognitiver Beeinträchtigungen assoziierten (Everitt & Robbins, 1997). Viele humane und tierexperimentelle Untersuchungen unterstützten seither die Korrelation zentraler cholinergischer Systeme und kognitiver Prozesse. So wurde der Einfluss des cholinergen Systems auf die Erinnerungsleistung bereits 1974 von Drachman und Leavitt anhand von Scopolamin, Methscopolamin und Physostigmin in Probanden untersucht. Die Applikation von Scopolamin führte zu einer Beeinträchtigung kognitiver Funktionen, nicht jedoch die Gabe von Methscopolamin oder Physostigmin (Drachman & Leavitt, 1974). Die additive Gabe von Scopolamin und Physostigmin hingegen war von einer Wiederherstellung der Scopolamin-induzierten kognitiven Beeinträchtigung begleitet (Drachman, 1977).

Eine Fülle von pharmakologischen Daten belegt nun, dass Anticholinergika wie Scopolamin kognitive Prozesse verschlechtern können und dass Procholinergika diese Defizite zumindest partiell wieder aufheben (Bartus et al., 1982; Mohammed, 1993; Everitt & Robbins, 1997). Interessanterweise war das Muster induzierter kognitiver Defizite und der Erinnerungsleistung in alten Probanden ähnlich ausgeprägt (Drachman & Leavitt, 1974). Direkte Anticholinergika wie Scopolamin modulieren kognitive Funktionen über die Interaktion mit muskarinischen Acetylcholinrezeptoren (mAChR) (Levin et al., 2006). Nikotin und nikotinerge Substanzen wirken als direkte Liganden an nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (nAChR) (Gotti et al., 2007). Für diese letzteren Substanzen wurde

ebenfalls ein indirekter Agonismus an mAChR berichtet (Levin et al., 2006). So könnte man sich vorstellen, dass die präsynaptische nAChR-Aktivierung über die Freisetzung von Acetylcholin und Interaktion mit mAChR die neuronale Aktivität steigert. Nikotinische Rezeptoren im cerebralen Cortex und Hippocampus sind aufgrund ihrer Rolle in kognitiven Prozessen von besonderem Interesse und Veränderungen nikotinerger cholinergischer Mechanismen wurden mit verschiedenen neuronalen Dysfunktionen oder mentalen Erkrankungen in Verbindung gebracht (Lena & Changeux, 1998; Leonard et al., 2001; Picciotto & Zoli, 2002; Raggenbass & Bertrand, 2002; Gotti & Clementi, 2004; Dani & Bertrand, 2007). Eine Vielzahl von humanen und tierexperimentellen Studien untersuchte die Assoziation zwischen neuronalen, nikotinerger Systemen und Lernen und Gedächtnis als spezielle Formen kognitiver Funktionen. Die Verabreichung von Nikotin war sowohl in humanen und Tierstudien mit einer verbesserten Gedächtnisleistung assoziiert (Rusted et al., 2000; Levin et al., 2006). Andere selektive nikotinerger Agonisten, beispielsweise Dimethylaminoethanol und Epibatidin (Levin et al., 2006), AR-R17779 (Levin et al., 1999) oder Lobelin (Rochford et al., 1996; Levin et al., 2006), zeigten ähnlich positive Befunde auf Lernen und Gedächtnis im Tierversuch (Levin et al., 2006). Hingegen führte die Verabreichung des nikotinerger Antagonisten Mecamylamin zu einer verschlechterten kognitiven Leistung (Levin & Simon, 1998). Nott et al. infundierten adulten, weiblichen Sprague-Dawley Ratten Antagonisten an  $\alpha_7$  (Methyllycaconitin) oder  $\alpha_4\beta_2$  (Dihydro- $\beta$ -Erythroidin) in den dorsalen Hippocampus und bestätigten das Ergebnis, dass die nAChR-Blockade mit einer signifikant verschlechterten Leistung des Arbeitsgedächtnisses einherging (Nott & Levin, 2006). Im Allgemeinen verbessern nikotinerger Agonisten spezifische Funktionen des Gedächtnisses, nikotinerger Antagonisten, beispielsweise Mecamylamin oder Läsionen des cholinergischer Apparats, führen zu einer beeinträchtigten kognitiven Leistung (Levin & Simon, 1998; Nott & Levin, 2006; Dani & Bertrand, 2007). Auf Basis solcher Befunde wurden procholinerger Therapeutika für die Behandlung von Demenzerkrankungen, insbesondere *Morbus Alzheimer*, entwickelt. Zurzeit verfügbare Therapieoptionen in Form der Acetylcholinesterase-Inhibitoren zeigten in klinischen Studien eine Verbesserung kognitiver Funktionen (Ritchie et al., 2004), jedoch in der Klinik nur einen limitierten Erfolg. Dies mag daran liegen, dass zusätzliche Läsionen zum pathologischen Geschehen der Alzheimer-Erkrankung beitragen (Palmer & Gershon, 1990).

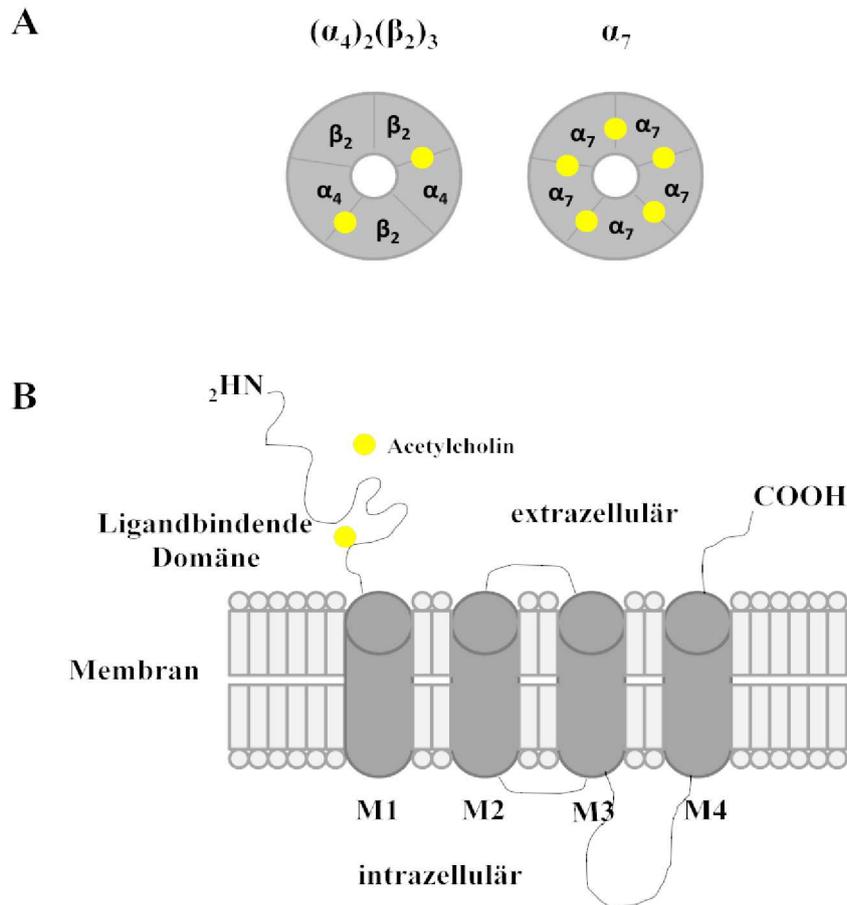
### 1.1.1. Neuronale nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR)

Neuronale nikotinische Acetylcholinrezeptoren sind Mitglieder der *Cys-loop* Ionenkanal-Rezeptoren, welche ebenfalls muskuläre AchR, GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>C</sub>, Glycin und 5HT<sub>3</sub>-Rezeptoren einschließen (Gotti et al., 2009). Obgleich die Subtypen der nAChR aufgrund der Vielfalt der Anordnung der Untereinheiten unterschiedliche pharmakologische und funktionelle Eigenschaften aufweisen (Dani & Bertrand, 2007), teilen alle nAChR ein gemeinsames Merkmal: die Bindung von Acetylcholin führt zunächst zu einer Erhöhung der Leitfähigkeit von Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> und Ca<sup>2+</sup>-Ionen des Rezeptors, welcher nach Millisekunden in einen nicht leitenden Zustand übergeht. Andauernde Exposition mit Agonisten, beispielsweise Nikotin, resultiert in einer Desensibilisierung des nAChR, welche den Rezeptor in einem geschlossenen, refraktären Zustand stabilisiert (Dani et al., 2000; Quick & Lester, 2002; Giniatullin et al., 2005; Dani & Bertrand, 2007). Desensibilisierung wird definiert als Verlust der biologischen Antwort auf langandauernde oder wiederholte Stimulation (Ochoa et al., 1989).

#### 1.1.1.1. Struktur und Funktion von neuronalen nAChR

Bindungsstudien mit nikotineren Radioliganden führten zur Entdeckung zweier differenter Klassen von nAChR im zentralen Nervensystem: eine Klasse von nAChR bindet [<sup>3</sup>H]-nikotinerge Agonisten mit hoher Affinität im nanomolaren Bereich, aber nicht  $\alpha$ -Bungarotoxin ( $\alpha$ Bgtx), den peptidischen Antagonisten des Muskel-Typs von nAChR (Govind et al., 2009). Eine zweite Klasse von nAChR zeigt eine höhere Affinität zu  $\alpha$ Bgtx und eine geringere Affinität zu Nikotin und nikotineren Liganden im mikromolaren Bereich (Gotti et al., 2007). Nachfolgende Klonierungsstrategien identifizierten 12 Gene, die für die Untereinheiten der nAChR codierten und klassifizierten diese in zwei Subfamilien aus 9  $\alpha$ - ( $\alpha_2$ - $\alpha_{10}$ ) und 3  $\beta$ - ( $\beta_2$ - $\beta_4$ ) Untereinheiten (Gotti et al., 2007). Allen neuronalen nAChR ist die pentamere Struktur gemein (Decker et al., 1995), die aus  $\alpha$ - ( $\alpha_7$ - $\alpha_{10}$ ) Untereinheiten oder einer heterogenen Komposition aus  $\alpha$ - ( $\alpha_2$ - $\alpha_6$ ) und  $\beta$ - ( $\beta_2$ - $\beta_4$ ) Untereinheiten besteht (Broad et al., 2006; Kenney & Gould, 2008). Die 5 transmembranären Untereinheiten umschließen die zentrale Ionenpore (Dani & Bertrand, 2007). Jede Untereinheit besteht aus 4 transmembranären, hydrophoben Domänen, einer großen intrazellulären Schleife und einem extrazellulären, hydrophilen N-Terminus (Gotti et al., 2009), welches die orthosterischen Ach-Bindungsstellen zwischen zwei

benachbarten Untereinheiten trägt (Broad et al., 2006) (s. **Abbildung 1.1**). Die  $\alpha_5$ - und  $\beta_3$ -Untereinheiten tragen weder primäre noch komplementäre Strukturen der Ach-Bindungsstelle (Gotti et al., 2007). Der nAChR ist ebenfalls Angriffspunkt allosterisch potenzierender Liganden. Deren Bindungsregion befindet sich auf  $\alpha$ -Untereinheiten bei Lys-125 des N-Terminus (Coyle et al., 2007). Die Heterogenität der Subtypen von nAChR in Pharmakologie und Funktion erklärt sich durch deren vielfältige mögliche Kompositionen und Stöchiometrien der Untereinheiten (Gotti et al., 2009).  $\alpha_4\beta_2^*$ -Rezeptoren (\* kennzeichnet Subklassen durch inkludierte Untereinheiten) und  $\alpha_7$ -Rezeptoren sind predominant im Gehirn und durch divergierende funktionelle Eigenschaften, beispielsweise den Affinitäten zu Nikotin oder  $\alpha$ Bgtx und der Schnelligkeit der Desensibilisierung (Fenster et al., 1997; Cordero-Erausquin et al., 2000; Kenney & Gould, 2008) oder der Inhibitionsdauer durch Mecamylamin (Papke et al., 2001; Kenney & Gould, 2008), gekennzeichnet. Studienbefunde belegen, dass Variationen des  $\alpha/\beta$ -Ratios der Untereinheiten mit einer differenten Sensibilität gegenüber Agonisten und mit unterschiedlichen Charakteristiken wie einer veränderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeabilität einhergehen können (Tapia et al., 2007; Gotti et al., 2009).  $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptoren und  $\alpha_7$ -Rezeptoren werden in großer Anzahl in Gehirnarealen exprimiert, denen Schlüsselrollen in kognitiven Prozessen wie Lernen und Gedächtnis zukommen (Broad et al., 2006).



**Abbildung 1.1:** Die Struktur des nAChR

**A** Die pentamere Struktur des nAChR. Der  $(\alpha_4)_2(\beta_2)_3$ -Rezeptor weist zwei Bindungsstellen für Acetylcholin auf, der  $\alpha_7$ -Rezeptor 5 Bindungsstellen zwischen benachbarten Untereinheiten. Modifiziert entnommen (Taly et al., 2009). **B** Jede Untereinheit besteht aus 4 transmembranären Domänen (M1-M4), der intrazellulären Schleife, dem hydrophilen carboxyterminalen Ende und dem N-Terminus, der die Ach-Bindungsstelle trägt. Modifiziert entnommen (Paterson & Nordberg, 2000).

nAChR finden eine breite Lokalisation im Gehirn auf dendritischen, somatischen, axonalen, präsynaptischen und postsynaptischen Strukturen (Dani & Bertrand, 2007). Während die präsynaptischen nAChR die Neurotransmitterfreisetzung, insbesondere von Acetylcholin (Ach), Dopamin (DA), Noradrenalin (NA), Glutamat und GABA stimulieren, mediiere postsynaptische nAChR direkt Excitation und synaptische Transmission der Zielzellen (Gotti et al., 2007). Es ist bekannt, dass Subtypen von nAChR ( $\alpha_4\beta_2$ ,  $\alpha_7$ ) die kognitiv verstärkenden Effekte von Nikotin verantworten (Rollema et al., 2009b). nAChR partizipieren über die präsynaptische verstärkte Freisetzung excitatorischer Neurotransmitter und den postsynaptischen Stimulus in Aspekten synaptischer Plastizität

(Placzek et al., 2009). Veränderungen der synaptischen Übertragung durch zelluläre Prozesse synaptischer Plastizität gelten als neurophysiologische Grundlage für Lern- und Gedächtnisvorgänge (Malenka & Bear, 2004; Placzek et al., 2009). Studien untersuchten den Beitrag von nAChR in neuroplastischen Prozessen mittels der Effekte von Nikotin und nikotinerger Liganden. Beispielsweise induzierte Nikotin die Langzeitpotenzierung (LTP) im Gyrus dentatus anästhesierter Mäuse ohne vorherige afferente Stimulation über die Aktivierung von nAChR - ein Effekt, welcher durch die Vorabgabe des nAChR-Blockers Mecamylamin inhibiert werden konnte (Matsuyama et al., 2000). LTP wird definiert als die langanhaltende Verstärkung der synaptischen Transmission (> 1 h) und ist als eine Form der synaptischen Plastizität direkt assoziiert mit zugrunde liegenden Mechanismen für Lernen und Gedächtnis (Kenney & Gould, 2008; Placzek et al., 2009). Die mit Nikotin vorgestellten Befunde konnten durch den Einsatz der nikotinerger Agonisten Epibatidin und Cholin, die ähnlich positive Effekte auf die synaptische Plastizität zum Vorschein brachten, bestätigt werden (Matsuyama & Matsumoto, 2003).

### **1.1.2. Cholinerge Systeme und *Morbus Alzheimer***

*Morbus Alzheimer* (AD=Alzheimer-Demenz) ist die weit verbreitete Form von Demenz (> 70%) und klar von den anderen Formen *vaskuläre Demenz*, *Lewy-Körper-Demenz*, *Parkinson-Erkrankung mit Demenz*, *frontotemporale Demenz* und *reversible Demenz* abzugrenzen (Castellani et al., 2010). Die Inzidenz der Erkrankung erfährt einen beachtlichen Anstieg mit dem Alter - Schätzungen zufolge erhöht sich die Neuerkrankungsrate bei Patienten im Alter > 85 Jahren (8,4%) gegenüber 65-69-Jährigen (0,6%) um annähernd das 14fache (Hebert et al., 1995). AD präsentiert sich klinisch als neurodegenerative Erkrankung mit dem Verlust des Gedächtnisses und kognitiver Leistungen, einschließlich der Beeinträchtigung der Sprache, motorischen und visuell-räumlichen Defiziten, sogar Tod (Cummings, 2004). Insbesondere der Neocortex und Hippocampus – Gehirnareale, welche mit höheren kognitiven Funktionen assoziiert werden – sind Schauplätze des pathologischen Geschehens der AD (Francis et al., 1999). Extensive Forschung über die vergangenen Jahrzehnte brachte zum Vorschein, dass Defekte cholinergischer synaptischer Transmission und im speziellen nAChR-vermittelte Signalwege die Pathogenese von AD begünstigen (Buckingham et al., 2009). Post-mortem Untersuchungen der Gehirne von Patienten mit AD verweisen auf Defizite in der nAChR-

Expression, eine abgeschwächte Aktivität von Cholinacetyltransferase und inaktivierenden Enzymen (Buckingham et al., 2009) und cholinergen Neuronenverlust (Whitehouse et al., 1982; Bartus et al., 1982). Diese Befunde führten zu der Entstehung der „cholinergen Hypothese“ von AD (Francis et al., 1999). Die pharmakologische Behandlung von AD basiert auf dem Einsatz von Inhibitoren der Acetylcholinesterase (AChE) trotz Verwendung des einzigen NMDA-Rezeptorantagonisten Memantin (Memando<sup>®</sup>) zur Therapie moderater bis schwerer Formen der Alzheimer-Demenz (Buckingham et al., 2009). Rivastigmin (Exelon<sup>®</sup>), Galantamin (Reminyl<sup>®</sup>) und Donepezil (Aricept<sup>®</sup>) verstärken die cholinerge Neurotransmission durch Hemmung der Acetylcholinhydrolyse (Lenzken et al., 2007) und demonstrierten in klinischen Studien einen nützlichen Effekt auf kognitive Funktionen (Ritchie et al., 2004). Zunehmende Befunde sprechen für eine Rolle der AChE-Inhibitoren in der Hemmung von Neurotoxizität (Takada et al., 2003; Kume et al., 2005) und der Modulation der Prozessierung des Amyloid-Precursor-Proteins (Racchi et al., 2004; Lenzken et al., 2007).

### **1.1.2.1. Pathogenese von *Morbus Alzheimer*: zugrunde liegende Mechanismen und die Rolle von nAChR**

Die Akkumulation von extrazellulären senilen Plaques aus amyloiden Peptiden und intrazellulären aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein bestehenden Neurofibrillen, sowie extensiver Neuronenuntergang sind pathologische Kennzeichen der AD (Buckingham et al., 2009). Neuropathologische Auffälligkeiten schließen oxidative Prozesse, glutamerge Excitotoxizität, Inflammation und apoptotische Vorgänge mit ein (Cummings, 2004). Es besteht ein genereller Konsens über die Schlüsselrolle des  $\beta$ -amyloiden Peptids im pathogenetischen Geschehen der AD (Hardy & Selkoe, 2002; Cummings, 2004). Die Prozessierung des Amyloid-Precursor-Proteins (APP) resultiert im amyloidogenen und nicht-amyloidogenen Signalweg (Nie et al., 2008). A $\beta$ -Peptide divergierender Aminosäurenlänge werden als Produkte der Abspaltung im Rahmen der amyloidogenen Prozessierung mittels  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretasen aus APP gewonnen (Walsh & Selkoe, 2007; Buckingham et al., 2009; Ono & Yamada, 2011). Hingegen führt die Spaltung des APP in der A $\beta$ -Domäne durch die  $\alpha$ -Sekretase zur Freisetzung des löslichen, N-terminalen Fragments sAPP $\alpha$  (Lenzken et al., 2007). Zahlreiche Studien demonstrierten die Beteiligung von A $\beta$  an den neurodegenerativen Prozessen in AD. Beispielsweise konnte in

transgenen Alzheimer-Mausmodellen die Entstehung neuritischer Plaques infolge Überexpression von APP beobachtet werden (Cummings, 2004). In transgenen Mäusen, welche den Genotyp APOE- $\epsilon$ 4 (Apolipoprotein E Typ 4 Allel) in Kombination mit humanem APP exprimierten, konnte eine verstärkte Deposition von A $\beta$  beobachtet werden im Vergleich zu APOE- $\epsilon$ 3 (Carter et al., 2001). APOE- $\epsilon$ 4 gilt als ein wichtiger Risikofaktor in der Ätiologie der AD (Corder et al., 1993) und es bestehen Hinweise auf eine direkte Interaktion mit nAChR (Buckingham et al., 2009). Der Studienbefund von Hock et al., die einen Nutzen von A $\beta$ -Antikörpern für kognitive Funktionen in Patienten mit AD nachwiesen (Hock et al., 2003), sowie die beobachtete A $\beta$ -induzierte neuronale Apoptose *in vitro* (Kihara et al., 1997; Yao et al., 2005) bestätigten die „Amyloid-Hypothese“ (Hardy & Selkoe, 2002). A $\beta$ -Peptide erlangen Toxizität auf Neuron und Synapse bei Aggregation zu Oligomeren (Dimer-Octamer), Protofibrillen und  $\beta$ -amyloid Fibrillen über die direkte Wirkung an der Synapse oder indirekte Stimulation von Microglia und Astrozyten (Ono & Yamada, 2011). Amyloidplaques sowie Neurofibrillen werden von Abnormalitäten in der Expression der nAChR begleitet (Kihara & Shimohama, 2004). Die Degradation von cholinergen Neuronen in AD war assoziiert mit einer signifikanten Reduktion spezifischer Subtypen von nAChR, insbesondere  $\alpha_4\beta_2$ - und  $\alpha_7$ -Rezeptoren (Buckingham et al., 2009). Der Studie von Whitehouse et al. (1982), die eine mehr als 75prozentige Reduktion von Neuronen des Nucleus basalis Meynert bei Patienten mit AD bescheinigte (Whitehouse et al., 1982; Castellani et al., 2010), folgten Untersuchungen zur Rolle von nAChR in AD. Radioligandbindungsstudien mit nikotinergen Liganden identifizierten einen 20-50% Verlust von nAChR in neocorticalen Bereichen und Hippocampi autopsierter Gehirne von Patienten mit AD (Court et al., 2001). Eine selektive Reduktion der Bindung an [ $^{125}$ I] $\alpha$ -Bungarotoxin war im temporalen, nicht jedoch dem frontalen Cortex ersichtlich (Davies & Feisullin, 1981; Court et al., 2001). Martin-Ruiz et al. detektierten eine reduzierte [ $^3$ H]Epibatidinbindung im temporalen Cortex von AD-Patienten, die einherging mit einer selektiven geringeren Expression von  $\alpha_4$ -, nicht jedoch von  $\alpha_3$ - und  $\alpha_7$ -Untereinheiten (Martin-Ruiz et al., 1999). Während weitergehende Studien den signifikanten Verlust von  $\alpha_4$ -Untereinheiten in Cortex (Burghaus et al., 2000; Guan et al., 2000) und Hippocampus (Guan et al., 2000) bestätigten, wies der Studienbefund von Engidawork et al. auf keine veränderte Expressionsdichte von  $\alpha_4$  im frontalem Cortex von AD-Patienten hin (Engidawork et al., 2001). Gotti et al. belegten durch Einsatz selektiver Antikörper gegen Untereinheiten des

nAChR in [<sup>3</sup>H]Epibatidin-gebundenen Fraktionen, dass die reduzierte Bindung zum radioaktiv markierten Liganden mit einem selektiven Verlust von  $\alpha_4$ - und  $\beta_2$ -Untereinheiten assoziiert war (Gotti et al., 2006). Als mögliche Ursache des Verlusts von nAChR wurde die gesteigerte Lipidperoxidation in Gehirnen von AD-Patienten postuliert. Yu et al. detektierten die Korrelation zwischen oxidativem Stress und der Expression von  $\alpha_4$  (Yu et al., 2003). Für A $\beta$  wurde ebenfalls ein direkter Einfluss auf die Expression des nAChR postuliert. Guan et al. demonstrierten, dass die Exposition von A $\beta$  auf PC12 Zellen einen signifikanten Verlust von  $\alpha_3$ -,  $\alpha_7$ - und  $\beta_2$ -Untereinheiten induzierte, welcher einherging mit einer verringerten Bindung von tritiiertem Epibatidin und  $\alpha$ -Bungarotoxin (Guan et al., 2001). *In vitro* induzierte A $\beta$  die neuronale Apoptose - ein Effekt, welcher durch Nikotin und nikotinerge Liganden reduziert werden konnte, nicht jedoch durch gleichzeitige Gabe von Mecamylamin (Kihara et al., 1997). Dieser neuroprotektive Effekt von Nikotin gegenüber A $\beta$  unter Beteiligung von nAChR konnte in weitergehenden Studien, beispielsweise von Zamani et al., belegt werden (Zamani et al., 1997) und wurde unter anderem assoziiert mit der Hochregulation von nAChR infolge der Stimulation mit nikotinergeren Liganden (Buckingham et al., 2009). Ähnliche Effekte wurden für die AchE-Inhibitoren postuliert. In einer Studie von Kume et al. reduzierten Donepezil und Galantamin den Glutamat-induzierten neurotoxischen Stimulus unter gleichzeitiger Demonstration einer signifikant verstärkten Expression von nACh-Rezeptoren, welche die neuroprotektiven Eigenschaften unterstützt (Kume et al., 2005). Es wäre möglich, dass die AchE-Inhibition und eine mögliche allosterische Modulation von nAChR – ein Effekt, wie er für Galantamin bereits beschrieben wurde (Kume et al., 2005; Coyle et al., 2007) – zu den neuroprotektiven Eigenschaften beiträgt (Buckingham et al., 2009). In einer Studie demonstrierte Galantamin induzierende Effekte auf die Sekretion von sAPP $\alpha$  in differenzierten Neuroblastomzellen über die Aktivierung von nAChR (Lenzken et al., 2007). sAPP $\alpha$  werden Funktionen in physiologischen Prozessen einschließlich Neuroprotektion (Mattson et al., 1993; Kögel et al., 2012), synaptischer Plastizität (Turner et al., 2003), Synaptogenese (Mattson & Furukawa, 1998), neuronaler Erregbarkeit und axonalem und dendritischen Wachstum (Kögel et al., 2012) zugespielt. Nie et al. (2007) demonstrierten an transfizierten SH-EP1- $\alpha_4\beta_2$ -hAPP695-Zellen, dass Nikotin und Epibatidin intrazelluläre und sezernierte A $\beta$ -Level reduzierten; ein Effekt, welcher durch die gleichzeitige Gabe des  $\alpha_4\beta_2$ -Antagonisten Dihydro- $\beta$ -Erythroidin umgekehrt werden konnte (Nie et al., 2008). Diese Befunde belegen einen regulatorischen Effekt aktivierter

nikotinischer Acetylcholinrezeptoren auf die A $\beta$ -Sekretion und eine mögliche Verschiebung der  $\beta$ -Amyloidogenese zum nicht pathogenetischen Signalweg (Buckingham et al., 2009).

### **1.1.3. Aspekte der nAChR-Modulation**

Der Generierung der „cholinergen Hypothese“ (Bartus et al., 1982) folgte die Entwicklung von Pharmakotherapeutika zur Balanzierung cholinergischer Dysfunktionen bei neurodegenerativen Erkrankungen. Die Aktivierung von nAChR durch Nikotin resultiert in einer gesteigerten kognitiven Leistungsfähigkeit sowie Belohnungseffekten, die zusammen mit erlernten oder konditionierten sowie sozialen Faktoren zu den abhängigkeiterzeugenden Eigenschaften von Nikotin beitragen (Benowitz, 2010). Es bestehen Hinweise darauf, dass der Nikotinabhängigkeit und Lernen ähnliche zelluläre und neuronale Substrate zugrunde liegen und ein Prozess, welcher den Nikotinabusus unterhält, eine abgewandelte Form des Lernens darstellt (Davis & Gould, 2009). Auf Basis der zentralen Rolle von  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR in der Entstehung und Aufrechterhaltung der Nikotinabhängigkeit wurde Modulatoren von nAChR ein therapeutischer Nutzen zugesprochen. Im Folgenden werden Aspekte der Nikotinabhängigkeit dargestellt sowie die Effektivität von  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR-Partialagonisten mit der Indikation Raucherentwöhnung besprochen.

#### **1.1.3.1. nAChR und Nikotinabhängigkeit**

Trotz des umfassenden Bewusstseins der schädlichen Wirkung von Tabakrauch stellt Rauchen die wichtigste vermeidbare Todesursache in Industrieländern dar (Taylor & Bettcher, 2000; Rollema et al., 2007b). Schätzungen zufolge wird die globale Mortalitätsrate von 5,4 Mio (2005) auf 6,4 Mio in 2015 ansteigen und damit für annähernd 10% aller Todesursachen verantwortlich sein. Prognostische Daten sehen einen weiteren Anstieg der tabakbezogenen Mortalität auf 8,3 Mio in 2030 voraus (Mathers & Loncar, 2006). Es ist unumstritten, dass Raucher ein hohes Abhängigkeitspotenzial entwickeln aufgrund der psychoaktiven Wirkung von Nikotin und wahrscheinlich weiterer im Tabak enthaltenen Substanzen (Rollema et al., 2007b). Inhalatives Nikotin tritt ins Gehirn innerhalb von Sekunden ein (Rose et al., 1999; Rollema et al., 2007b) mit einer maximalen

Konzentration nach 2 min (Rollema et al., 2007b). Die Folge ist ein schneller und stoßartiger Anstieg der Dopaminfreisetzung im mesolimbischen Dopamin-System, dem Corpus Striatum und dem frontalen Cortex (Benowitz, 2010). Die genannten Strukturen vermitteln die belohnenden und abhängigkeiterzeugenden Effekte von Nikotin. Zudem ist bekannt, dass Nikotin weitere Neurotransmittersysteme aktiviert, unter anderem über die Interaktion mit inhibitorischen GABAergen oder excitatorischen Glutamatneuronen, welche die dopaminerge Ausschüttung regulieren (Mansvelder & McGehee, 2000; Mansvelder & McGehee, 2002). Jedoch brachten vorangegangene Studien keinen Nikotin-induzierten Dopaminanstieg bei nAChR-Blockade zu Tage (Giorguieff-Chesselet et al., 1979; Imperato et al., 1986; Crunelle et al., 2010). Untersuchungen an transgenen Mäusen bestätigten den Befund, dass Nikotin die extrazelluläre Dopaminkonzentration über die Stimulation von  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR erhöht (Picciotto et al., 1998; Marubio et al., 2003). Picciotto et al. untersuchten in ihrer Studie die Beteiligung von nAChR auf Nikotin-induzierte verstärkende Effekte an transgenen  $\beta_2$ -defizienten Mäusen. Der Verlust der  $\beta_2$ -Untereinheit führte zu einem Verlust der Nikotin-induzierten Dopaminfreisetzung im ventralen Striatum, einer abgeschwächten Selbstaufnahme von Nikotin *in vivo* und einer reduzierten Feuerungsrate infolge Nikotinstimulation (Picciotto et al., 1998). Hingegen konnten die pharmakologischen und das Verhalten betreffenden Effekte von Nikotin durch die Reinsertion des  $\beta_2$ -Gens in der Area tegmentalis ventralis von  $\beta_2^{-/-}$ -Mäusen wiederhergestellt werden (Maskos et al., 2005). Diese und weitere Befunde, die einen Ausfall des Nikotin-induzierten Dopaminanstiegs in  $\alpha_4$ -defizienten Mäusen demonstrierten (Marubio et al., 2003), belegen die Vermittlung der Nikotineffekte über die Aktivierung von  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR (Rollema et al., 2007b). Die Stimulation von nAChR in der Area tegmentalis ventralis bedeutet eine gesteigerte Aktivität von Dopamin im Nucleus accumbens und die Generierung belohnender Effekte, welche wesentlich zur Aufrechterhaltung des Nikotinabusus beitragen (Crunelle et al., 2010), ebenso wie das Auftreten von Entzugssymptomen bei Nikotinverzicht (Benowitz, 2010).

nAChR sind im frontalen Cortex direkt an Aufmerksamkeit, Gedächtnis und assoziativem Lernen beteiligt und partizipieren in Prozessen hippocampaler synaptischer Plastizität (Crunelle et al., 2010). Nikotin induziert Neuroadaptationen, beispielsweise die Hochregulation von  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR als Folge deren Aktivierung und Desensibilisierung (Penton & Lester, 2009). Post-mortem Untersuchungen an Gehirnen von Rauchern zeigten eine gesteigerte Radioligandbindung durch die chronische Nikotinzufuhr (Benwell et al.,

1988; Perry et al., 1999). Bestätigt wurden diese Befunde mittels tierexperimenteller Untersuchungen (Marks et al., 1983; Schwartz & Kellar, 1983; Yates et al., 1995). Die Mechanismen, die der Nikotin-induzierten Hochregulation zugrunde liegen, sind vielfältig: generell besteht ein Konsens über unveränderte  $\alpha_4\beta_2$ -mRNA-Transkripte infolge Nikotinverabreichung (Marks et al., 1992; Peng et al., 1994; Penton & Lester, 2009). Hingegen werden posttranskriptionelle Vorgänge postuliert, einschließlich einer veränderten Translation (Penton & Lester, 2009), einer gesteigerten Reifung und Zusammenbau der Untereinheiten (Nashmi et al., 2003; Sallette et al., 2005), eines verlangsamten Rezeptorstoffwechsels (Peng et al., 1994), Rezeptortranslokationen (Bencherif et al., 1995; Darsow et al., 2005), Konformationsänderungen (Vallejo et al., 2005) oder einer Blockade der Proteindegradation im Endoplasmatischen Retikulum (Rezvani et al., 2007).

### **1.1.3.2. nAChR-Modulatoren zur Behandlung der Nikotinabhängigkeit**

Zwei therapeutische Ansätze waren der Ursprung für die Pharmakotherapie der Nikotinabhängigkeit. Die antagonistische Blockade von nAChR diente der Vermeidung der Stimulation des Belohnungszentrums und die Aktivierung dieser Rezeptoren bezweckte die Unterdrückung von Rauchverlangen und Entzugssymptomatik (Rollema et al., 2007b). Mecamylamin, der unspezifische Antagonist an nAChR, reduzierte in Studien dosisabhängig Nikotin-vermittelte Effekte, produzierte jedoch signifikante Nebenwirkungen einschließlich Benommenheit, Hypotension und Obstipation (Lancaster & Stead, 2000). Antagonisten an nAChR werden mit der Induktion der Entzugssymptomatik assoziiert (Crunelle et al., 2010). Die Vollagonisten in Form der Nikotinersatzmittel (NRT) imitieren die Nikotin-induzierte Aktivierung von nAChR und reduzieren Entzugssymptome infolge Nikotinabstinenz (Carrozzi et al., 2008; Crunelle et al., 2010). Alle getesteten Formen von NRT (Kaugummi, Pflaster, Nasalspray, inhalatives und sublinguales Nikotin) führten zu signifikant erhöhten Abstinenzraten (1,5-2fach) im Vergleich zu Placebo (Silagy et al., 2004). Der Einsatz des nAChR-Antagonisten Mecamylamin in Kombination mit Nikotin deutete auf höhere Abstinenzraten durch das agonist-antagonistische Wirkprinzip hin (Rose & Levin, 1992; Lancaster & Stead, 2000). Folge von Schwierigkeiten in der Applikation zweier Substanzen mit pharmakokinetisch und metabolisch unterschiedlichen Profilen war die Entwicklung von partiellen Agonisten

mit dualem Agonist-Antagonist-Charakter (Rollema et al., 2007b). Diese Substanzen sind attraktive Optionen für die Unterdrückung von Rauchverlangen und Entzugssymptomatik durch eine partielle Aktivierung von nAChR im Vergleich zum vollen Agonisten. Dessen pharmakodynamische Effekte werden durch die antagonistische Blockade des nAChR durch den Partialagonisten verhindert (Rollema et al., 2007b). Bislang ist nur der  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR-Partialagonist Vareniclin für die Indikation Raucherentwöhnung in Europa zugelassen.

### 1.1.3.2.1. Vareniclin

Vareniclin wurde auf Basis des natürlichen Alkaloids Cytisin synthetisiert (Coe et al., 2005), dessen partialagonistische Aktivität an  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR von Papke et al. gezeigt wurde (Papke & Heinemann, 1994). Cytisin (Tabex<sup>®</sup>) besitzt aktuell keine europaweite Zulassung. Die erste Placebo-kontrollierte, monozentrische Studie aus 2011 zeigte jedoch eine 3,5fache Steigerung der Abstinenzquote nach 12 Monaten von 2,4% auf 8,4% (West et al., 2011). Cytisin wurde als kostengünstige Alternative zu anderen Pharmakotherapien beschrieben (West et al., 2011). Im Vergleich zu Cytisin soll Vareniclin eine längere Halbwertszeit, eine bessere Gehirnpenetration und eine höhere Affinität zu  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR besitzen (Crunelle et al., 2010). Vareniclin wurde für die partielle Aktivierung von  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR entwickelt, obgleich die Substanz ebenfalls vollagonistisch an  $\alpha_7$ -Rezeptoren bindet (Mihalak et al., 2006; Cahill et al., 2012). Mit einer freien Plasmakonzentration von 30 nM und der hohen Affinität zu  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR ( $K_i=0,1$  nM) (Rollema et al., 2007b) kann Vareniclin Nikotin von seinem Rezeptor verdrängen. Die Beurteilung der *in vivo* Wirksamkeit von Vareniclin wurde über seine Effekte auf den mesolimbischen Dopaminstoffwechsel gemessen (Coe et al., 2005). Konzentrationen von Dopamin und seinen Metaboliten wurden im Nucleus accumbens von männlichen Sprague-Dawley Ratten 1 h nach Applikation detektiert. Der agonistische Effekt von Vareniclin wurde mit 32% der maximalen Nikotin-induzierten Dopaminantwort bestimmt (Coe et al., 2005). Der antagonistische Effekt von Vareniclin wurde in Gegenwart von Nikotin bewertet. Die gleichzeitige Gabe von Nikotin und Vareniclin führte zu einer Unterdrückung des Nikotin-induzierten Effekts auf den Dopaminanstieg. Die *in vivo* Eigenschaften von Vareniclin veranschaulichen seine Fähigkeit, die Nikotin-induzierte Dopaminantwort abzuschwächen und gleichzeitig einen ausreichenden dopaminergen Stimulus für die Vermeidung von

Rauchverlangen und Entzugssymptomatik zu erzeugen (Coe et al., 2005). Die Beurteilung der klinischen Effektivität wurde in nachfolgenden Studien untersucht. Ein jüngst erschienener Cochrane Review erfasste eine Signifikanz der Vareniclinintervention in 13 der 15 durchgeführten Studien gegen Placebo (Cahill et al., 2012). Drei der klinischen Studien schlossen einen Bupropionarm mit ein (Gonzales et al., 2006; Jorenby et al., 2006; Nides et al., 2006). Die klinische Wirksamkeit gegenüber Bupropion überzeugte unter anderem in der Studie von Gonzales et al. (2006). 1025 gesunde Raucher im Alter von 18-75 Jahren wurden in dieser randomisierten, multizentrischen und doppelblinden Phase 3 Studie getestet. 12 Wochen Behandlung folgte eine Nachbeobachtung von 40 Wochen. Signifikant mehr Patienten, die mit Vareniclin in einer Dosis von 2 mg/d behandelt wurden, waren abstinent nach 12 und 24 Wochen im Vergleich zu Bupropion. Nach jedem Zeitpunkt (12, 24, 52 Wochen) konnte eine Überlegenheit gegenüber Placebo gemessen werden. Auch konnte die Behandlung mit Vareniclin das Rauchverlangen sowie die Rauchbefriedigung bei Rückfall signifikant reduzieren (Gonzales et al., 2006). Eine signifikante Überlegenheit gegenüber Placebo und Bupropion auch nach einem Jahr Nachbeobachtung konnte in der parallelen Studie von Jorenby et al. bestätigt werden (Jorenby et al., 2006). Tonstad randomisierte erfolgreich abstinente Studienteilnehmer in eine zusätzliche Behandlung mit Vareniclin oder Placebo über 12 Wochen und fand einen signifikanten Effekt von Vareniclin hinsichtlich der Rückfallquote nach Beendigung des Therapieregimes (Tonstad, 2006). Aubin et al. (2008) bewerteten in ihrer unverblindeten Studie die Effektivität von Vareniclin versus NRT (transdermales Nikotin). 12 Wochen Intervention mit Vareniclin führten zu einer signifikanten Überlegenheit von Vareniclin (56%) gegenüber 10 Wochen NRT (43%) bei Beendigung der Behandlung. Es ist jedoch zu erwähnen, dass sich dieser Effekt nach einem Jahr Nachbeobachtung numerisch angleich (26% versus 20%). Vareniclin reduzierte signifikant Rauchverlangen, Entzugssymptomatik und Rauchbefriedigung im Vergleich zu NRT (Aubin et al., 2008). Eine Metaanalyse der vier häufigsten signifikanten Nebenwirkungen in den Vareniclin- und Placebogruppen ermittelte ein relatives Risiko von 3,28 für Nausea, 2,91 für abnormale Träume, 1,62 für Insomnia und 1,18 für Kopfschmerzen (Cahill et al., 2012). Phase 4 Überwachungsstudien assoziierten Vareniclin mit möglichen großen Gesundheitsrisiken, einschließlich suizidalen Gedanken, kardiovaskulären Risiken oder Depression (Cahill et al., 2012).

Da nAchR mit der Entstehung vielfältiger mentaler Erkrankungen assoziiert wurden, war

es nicht verwunderlich, dass Modulatoren von nAChR als potenzielle Optionen, unter anderem für die Behandlung der Abhängigkeit, der Depression oder von Erkrankungen, die mit kognitiven Dysfunktion einhergehen, deklariert wurden (Rollema et al., 2009b). Sowohl präklinische als auch klinische Studien sprechen für Effekte von Vareniclin bei der Behandlung der Alkoholsucht (Steensland et al., 2007; McKee et al., 2009) sowie bei der Depression, unter anderem durch die Wirkverstärkung des SSRI Sertralin (Rollema et al., 2009a). Der Einsatz von nAChR-Modulatoren in Kognitionsmodellen basiert auf der Beteiligung cholinergischer Mechanismen an kognitiven Prozessen (Everitt & Robbins, 1997), dem Verlust von nAChR bei *Morbus Alzheimer* und im zunehmendem Alter (Dunbar et al., 2007) und dem therapeutischen Nutzen der AchE-Inhibitoren (Rollema et al., 2009b). Einige  $\alpha_4\beta_2$ -Liganden wurden hinsichtlich ihrer kognitiv verstärkenden Effekte in Nichtrauchern getestet. Beispielsweise wurden für den Partialagonisten Isproniclin verstärkende, dosisabhängige Effekte in verschiedenen kognitiven Aufgabenstellungen bei Patienten mit altersbedingter kognitiver Verschlechterung ermittelt (Dunbar et al., 2007). Potter et al. (1999) untersuchten in ihrer Studie den Effekt des nikotinergen Agonisten ABT-418 in AD-Patienten und beobachteten eine signifikante Verbesserung in verbalen und nicht-verbalen Aufgabenstellungen wie räumlichem Lernen (Potter et al., 1999). Die Effekte von Vareniclin in der Objektwiedererkennung veranschaulichten einen Effekt auf das deklarative Gedächtnis in Ratten (Rollema et al., 2009b). In einer kleinen klinischen Studie mit 67 Rauchern konnten infolge einer dreiwöchigen Vorbehandlung mit Vareniclin geringe, jedoch signifikante Effekte auf das Arbeitsgedächtnis gemessen werden während einer dreitägigen Nikotinabstinenz (Patterson et al., 2009). Diese Daten sprechen für eine mögliche nützliche Wirkung von Vareniclin bei Erkrankungen, die mit einer kognitiven Dysfunktion einhergehen.

### **1.2. Körperliches Training und Kognition**

Zahlreiche wissenschaftliche Studien belegen einen Nutzen körperlicher Aktivität für die Gesundheit. Positive Auswirkungen infolge physischer Aktivität wurden unter anderem mit einer Reduktion kardiovaskulärer Erscheinungen und Mortalität (Shiroma & Lee, 2010; Voss et al., 2011) sowie einem reduzierten Risiko für Typ 2 Diabetes (Laaksonen et al., 2005) und neurodegenerative Erkrankungen assoziiert (Erickson et al., 2012). Verschiedene Trainingsprotokolle, die sich in Intensität und Länge unterscheiden, wurden

für die Untersuchung Trainings-induzierter Effekte angewandt. Regelmäßiges, aerobes Training wird durch eine gesteigerte Herzfrequenz und Zunahme des Sauerstoffverbrauchs über einen anhaltenden Zeitraum definiert und geht mit einer Verbesserung der kardiovaskulären Fitness einher (Ahlskog et al., 2011). Untersuchungen zur Beeinflussung kognitiver Fähigkeiten und deren zugrunde liegende Mechanismen infolge der Anwendung chronischer, aerober Trainingsprotokolle sollen im Fokus der vorliegenden Arbeit stehen.

### 1.2.1. Untersuchungen am Menschen

Es gilt als wissenschaftlich gesichert, dass die zahlreichen positiven Effekte körperlicher Bewegung auch im zentralen Nervensystem wirken (O'Callaghan et al., 2007). Anhand epidemiologischer Studien konnte gezeigt werden, dass körperliche Aktivität protektive Effekte auf den Erhalt kognitiver Funktionen ausübt (Laurin et al., 2001; Yaffe et al., 2001; Abbott et al., 2004; Podewils et al., 2005; Larson et al., 2006). So wurde beispielsweise in einer in JAMA veröffentlichten prospektiven Kohortenstudie die tägliche Wegstrecke von 2257 männlichen, physisch gesunden Probanden (Alter: 71-93) zwischen 1991 und 1993 aufgezeichnet (Abbott et al., 2004). Dabei konnte bei den Studienteilnehmern, die weniger als 0,25 Meilen pro Tag zurücklegten, ein fast doppelt so hohes Risiko für Demenz (1,8fach) beobachtet werden im Vergleich zu den Männern, welche mehr als 2 Meilen pro Tag Wegdistanz zurücklegten. Dieses Studienergebnis verdeutlicht, dass ein andauerndes Training wie tägliches Spazierengehen in direkter Assoziation mit der klinischen Ausprägung von Demenzerkrankungen steht (Abbott et al., 2004). Weitere Studien bestätigten diesen Befund. In der ACT-Studie von Larson et al. (ACT=*Adult Changes of Thought*) wurde eine Kohorte von 1740 Männern und Frauen im Alter  $\geq 65$  Jahren prospektiv beobachtet (Larson et al., 2006). Nach durchschnittlich 6,2 Jahren hatten 158 Personen eine Demenz und 107 Personen *Morbus Alzheimer* entwickelt. Dabei lag die Erkrankungsrate der Probanden, welche mehr als dreimal pro Woche körperlich aktiv waren (Gehen, Wandern, Fahrrad fahren, Schwimmen, Gymnastik, Wassergymnastik, Krafttraining oder weitere Trainingseinheiten), im Vergleich zu weniger aktiven Studienteilnehmern signifikant niedriger (13 auf 1.000 Personenjahre versus 19,7 auf 1.000 Personenjahre) (Kramer et al., 2006; Larson et al., 2006). Diese Daten lassen vermuten, dass ein reguläres Training von mindestens dreimal pro Woche über 15 min das Risiko einer Demenzerkrankung, beispielsweise der Alzheimer-Demenz, signifikant zu reduzieren

vermag. Dieser Effekt war jedoch geringer bei bereits trainierten Studienteilnehmern (Larson et al., 2006). Es war nicht auszuschließen, dass Studienteilnehmer bereits an einer nicht-diagnostizierten frühen Demenzform erkrankt waren und diese den Grund für die geringe physische Aktivität darstellte (Weuve et al., 2004; Winter et al., 2007). Ebenfalls war es möglich, dass die neuroprotektiven Effekte körperlichen Trainings auf einen generell gesünderen Lebensstil zurückzuführen waren (Winter et al., 2007). So untersuchten beispielsweise Kalmijn et al. prospektiv anhand eines Studienkollektivs von 5386, nicht-dementen Probanden den Zusammenhang zwischen der Inzidenz dementieller Erkrankungen und einem hohem Cholesterol- und Fettanteil in zugeführter Nahrung mit dem Ergebnis einer positiven Korrelation (Kalmijn et al., 1997). Eine weitere publizierte Studie ermittelte einen Zusammenhang zwischen Atherosklerose und der Ätiologie von dementiellen Erkrankungen (Hofman et al., 1997). Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass atherosklerotische Veränderungen (Gefäßwanddicke, Plaques, erhöhter systolischer Blutdruck) das Risiko von Demenzerkrankungen wie *Morbus Alzheimer* und *vaskulärer Demenz* erhöhte. Ebenfalls ein wichtiger Risikofaktor für Atherosklerose und verschiedene Formen von Demenz ist der Konsum von Tabak (Ott et al., 1998). Kardiovaskuläre Risikofaktoren können demnach ebenfalls Risikofaktoren für die Entstehung einer Demenz darstellen (Heyn et al., 2004). Zur Unterstützung eines direkt kausalen Zusammenhanges zwischen körperlicher Aktivität und kognitiven Funktionen wurden in den nachkommenden Jahren Interventionsstudien durchgeführt. In der Metaanalyse von Colcombe und Kramer, die 18 Studien aus den Jahren 1966-2001 statistisch evaluierten, postulierten die Autoren robuste, aber selektive Effekte aeroben Trainings auf kognitive Funktionen (Colcombe & Kramer, 2003). In die Analyse aufgenommen wurden randomisierte kontrollierte Studien, deren gesunde Teilnehmer ein aerobes Training durchlaufen hatten. Diese beschriebenen selektiven Effekte äußerten sich vor allem in einer Verbesserung exekutiver Kontrollfunktionen nach regelmäßigem Training (Colcombe & Kramer, 2003). Exekutive Kontrollfunktionen beinhalten beispielsweise Aufgaben zum Arbeitsgedächtnis oder zum Planen (Kramer et al., 2006). Es ist also nicht möglich, von dem Effekt physischer Aktivität auf die kognitive Eigenschaft zu sprechen. Inwiefern Patienten mit manifester kognitiver Beeinträchtigung von körperlicher Bewegung profitierten, wurde in der Metaanalyse von Heyn et al. zusammenfassend dargestellt (Heyn et al., 2004). Diese Analyse schloss randomisierte kontrollierte Studien zwischen 1970-2003 mit ein, deren Studienteilnehmer ein Alter  $\geq 65$  Jahren erreichten und einen MMSE

Score < 26 aufwiesen. Körperliches Training verbesserte physische Fitness und kognitive Funktionen auch bei Patienten mit Demenz oder kognitiver Beeinträchtigung (Heyn et al., 2004). Trotz vieler positiver Befunde eines inversen Verhältnisses zwischen körperlicher Beanspruchung und kognitiver Degeneration existieren Studienergebnisse, die keinen Trainings-induzierten prokognitiven Effekt nachweisen konnten (Hill et al., 1993).

Belegt werden können Korrelationen zwischen körperlicher Aktivität und kognitiver Leistungsfähigkeit durch moderne Untersuchungsmöglichkeiten wie PET (Positronen-Emissions-Tomografie) und fMRI (funktionale Magnetresonanz-Tomografie), die die physiologische Gehirnstruktur sichtbar machen. Es ist unumstritten, dass das Gehirn im natürlichen Alterungsprozess strukturellen und funktionalen Änderungen unterliegt (Hedden & Gabrieli, 2004; Raz et al., 2005). In einer publizierten Studie von 2006 wurden Patienten in einem 6monatigen Ausdauerprogramm mit einer nicht-aerob trainierenden Kontrollgruppe verglichen (Colcombe et al., 2006). Die Autoren fanden in den Patienten, die das Ausdauersportprogramm durchliefen, eine signifikante Zunahme an weißer und grauer Substanz. Diese Daten suggerieren eine mögliche Wiederherstellung des altersbedingten Verlusts an Gehirnmasse durch reguläre körperliche Bewegung (Kramer et al., 2006). Bestätigt werden konnten die strukturellen Veränderungen des alternden menschlichen Gehirns und der regulierende Effekt physischer Aktivität in der Studie von Erickson et al. (2011). Diese einseitig verblindete, kontrollierte Studie schloss 120 Patienten (Alter  $\geq$  65 Jahre) mit ein, die entweder ein aerobes körperliches Trainingsprogramm durchliefen oder in die Kontrollgruppe randomisiert wurden (Erickson et al., 2011). Mittels MRI wurde in der Kontrollgruppe ein signifikanter Verlust an Hippocampusgewebe nach einem Jahr gefunden (1,40-1,43%). Hingegen konnte eine signifikante Zunahme von Gehirngewebe in den trainierten Individuen beobachtet werden (1,97-2,12%), die mit einer Verbesserung des räumlichen Erinnerungsvermögens einherging (Erickson et al., 2011). Eine ältere prospektive Studie von 1990 untersuchte pensionierte und arbeitende Studienteilnehmer im Alter von 62-70 Jahren (Rogers et al., 1990). Dabei durchlief eine Gruppe der pensionierten Probanden zusätzlich ein körperliches Trainingsprogramm. Die Patienten, die physisch aktiv waren oder arbeiteten, schnitten in kognitiven Aufgaben besser ab als die Probanden der pensionierten, unfitten Studiengruppe nach einer Nachbeobachtung von 4 Jahren. Dieser Befund war begleitet von einer konstanten cerebralen Perfusion infolge körperlichen Trainings. Hingegen wiesen die Probanden, welche auf eine psychische und körperliche Beanspruchung verzichteten, über

die Nachbeobachtung eine signifikant verschlechterte cerebrale Durchblutung auf (Rogers et al., 1990). Dieses Studienergebnis konnte von Burdette et al. (2010) bestätigt werden, die in trainierten Individuen eine signifikant verstärkte Durchblutung des Hippocampus (54 ml/100g/min) im Vergleich zu den untrainierten Teilnehmern (38 ml/100g/min) messen konnten (Burdette et al., 2010). Dieses Ergebnis war im Einklang mit einer Trainings-induzierten Vergrößerung des cerebralen Blutvolumens (Pereira et al., 2007).

### **1.2.2. Tierexperimentelle Untersuchungen**

Humane klinische Studien geben Hinweise auf einen Nutzen körperlichen Trainings für neurokognitive Funktionen. Diese teils kontroversen Studienergebnisse wurden belegt durch zahlreiche Studienbefunde aus Tierversuchen, die einen Einblick in die zugrunde liegenden Mechanismen erlaubten. Untersuchungen am Tier beschränkten sich dabei im Wesentlichen auf den Hippocampus, der eine Schlüsselrolle einnimmt in kognitiven Prozessen, die das Lernen und Gedächtnis betreffen (van Praag, 2009). Diese Struktur ist charakterisiert durch enorme Zellverluste bei Patienten mit *Morbus Alzheimer* und wurde mit räumlichem Lernen und Gedächtnisbildung assoziiert (Kramer et al., 2006). Verhaltensstudien an Tieren, die einem körperlichen Training unterzogen wurden, zeigten verbesserte kognitive Leistungen in Hippocampus-abhängigen Aufgaben (Kramer et al., 2006). Beispielsweise wurden in der Studie von Fordyce und Wehner adulte Mäuse, die auf Laufbändern für 8 Wochen liefen (5 Tage/Woche, 60 min/d, 12 m/min), nach Beendigung des Laufprotokolls im Morris Wasserlabyrinth getestet. Trainierte Tiere schnitten mit einer signifikant verringerten Zeit zur Auffindung der Plattform bzw. einer signifikant erhöhten (2-12fach) räumlichen Lernleistung ab im Vergleich zu den untrainierten Kontrolltieren (Fordyce & Wehner, 1993). Hingegen war das Schwimmtempo nicht signifikant verschieden zwischen den untersuchten Tiergruppen. Es existieren hinreichend Studien, die ein verbessertes Lernvermögen als Folge physischer Aktivität in Nagern belegen (van Praag et al., 1999; Anderson et al., 2000; Vaynman et al., 2004b). Ähnliche Resultate wurden in Studien beobachtet, welche sich transgener Mausmodelle der Alzheimer-Erkrankung bedienen. Eine publizierte Studie (2005) testete transgene Alzheimer-Mäuse hinsichtlich ihres Lernvermögens infolge physischer Belastung (Adlard et al., 2005). Neben einer signifikant verkürzten Zeit zur Auffindung der Plattform im Morris Wasserlabyrinth gegenüber untrainierten Kontrolltieren konnten 5

Monate körperliches Training die Akkumulation extrazellulärer Amyloid-Plaques in Cortex und Hippocampus reduzieren (Adlard et al., 2005).

### **1.2.2.1. Zugrunde liegende molekulare und zelluläre Trainingseffekte**

Tierexperimentelle Untersuchungen dienen der Aufklärung zugrundeliegender Mechanismen für die Trainings-induzierte Verbesserung kognitiver Aufgaben. Van Praag et al. untersuchten anhand eines freiwilligen Laufprotokolls Trainings-induzierte Effekte auf das Lernvermögen und die synaptische Plastizität in 34 weiblichen C57BL/6-Mäusen (van Praag et al., 1999). Injektionen mit 5-Bromo-2'-Desoxyuridin (BrdU) wurden zum Zwecke der diagnostischen Markierung von sich teilenden Zellen als Marker für eine gesteigerte Neurogenese durchgeführt und gingen der Testung im Morris Wasserlabyrinth und LTP-Messungen voraus. Das Ergebnis brachte ein verbessertes räumliches Lernen, sowie eine gesteigerte LTP im Gyrus dentatus und eine Neurogenese zu Tage (van Praag et al., 1999). Die Effekte physischer Aktivität auf eine gesteigerte hippocampale Neurogenese sind hinreichend belegt (Fabel et al., 2003; Farmer et al., 2004) und wurden mit einer verbesserten kognitiven Funktion assoziiert (Pereira et al., 2007; van Praag, 2008; Creer et al., 2010). Van Praag et al. beschrieben einen 3-4fachen Anstieg neu entstandener Zellen im Gyrus dentatus infolge Trainings und charakterisierten körperliches Training demnach als einen der stärksten neurogenetischen Faktoren (van Praag, 2009). Van Praag et al. untersuchten ebenfalls neuroprotektive Effekte infolge physischer Aktivität auf Lernen und Gedächtnis in jungen und alten (19 Monate) C57BL/6-Mäusen. Es konnten die Ergebnisse in Tieren jüngerer Alters bestätigt werden, dass körperliches Training mit einer verbesserten Lernleistung und Neurogenese auch im Alter einherging (van Praag et al., 2005). Dieses Ergebnis veranschaulichte, dass körperliches Training die altersbedingte Abnahme hippocampaler Neurogenese (Kuhn et al., 1996) aufhalten kann. Ähnliches gilt für Trainingseffekte auf die Neuroplastizität des Gehirns. Interessanterweise wurde auf zellulärer Ebene eine altersbedingte Abnahme von synaptischen Kontakten, synaptischer Stärke und neuronaler Plastizität in Hippocampus und Cortex berichtet (Chen et al., 1995; van Praag, 2009). Körperliches Training steigerte die synaptische Plastizität nicht nur durch eine Verstärkung der Systeme, die die neuronale Plastizität unterhalten, beispielsweise der Neurogenese, sondern ebenfalls durch eine direkte Beeinflussung synaptischer Strukturen und Potenzierung deren Signalstärke (Cotman et al., 2007). Eine

Zunahme des LTP infolge körperlicher Aktivität in hippocampalen Gewebeschnitten aus trainierten Mäusen (van Praag et al., 1999) und *in vivo* in Ratten wurde bereits publiziert (Farmer et al., 2004; van Praag, 2009). Die Trainings-induzierte Erhöhung des LTP war assoziiert mit einer veränderten morphologischen Struktur wie der Länge der Dendriten oder der Dichte derer Dornfortsätze (Cotman et al., 2007). Auch ging körperliche Aktivität mit einer gesteigerten Expression von Genen (Stranahan et al., 2010), Genprodukten (Vaynman et al., 2004a; Vaynman et al., 2006) und Transkriptionsfaktoren (Shen et al., 2001), die die synaptische Plastizität regulieren, einher (Ahlskog et al., 2011).

Trainings-induzierte Effekte auf cerebrale Blutgefäße sind ebenfalls beschrieben. Körperliches Training steigerte die Proliferation von Endothelzellen und die Angiogenese im Gehirn (van Praag, 2009). Während die Effekte physischer Aktivität auf die Neurogenese überwiegend im Hippocampus, speziell im Gyrus dentatus, ablaufen, werden angiogenetische Prozesse für breitere Hirnareale postuliert (Voss et al., 2011), unter anderem für das Kleinhirn (Black et al., 1990) und den primären motorischen Cortex (Kleim et al., 2002). Diese Effekte wurden mit Lernen und Gedächtnisbildung assoziiert (Kerr et al., 2010; Voss et al., 2011), scheinen aber bei alten Tieren keine Trainings-induzierte Regulation zu erfahren (van Praag et al., 2005). Der Einfluss auf die Neurogenese und Angiogenese wird überwiegend den Effekten von VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) und IGF (*Insulin-like growth factor*) zugesprochen, welche infolge körperlichen Trainings eine signifikante Hochregulation erfahren (Cotman et al., 2007). Als der wichtigste neurotrophische Faktor, der durch körperliches Training reguliert wird, wird jedoch BDNF angesehen aufgrund seiner Bedeutsamkeit in synaptischer Plastizität (Cotman et al., 2007) und seiner Wirkung auf Proliferation, Differenzierung und Überleben von Neuronen (Waterhouse & Xu, 2009).

### **1.2.3. BDNF und seine Regulation**

BDNF (*Brain derived neurotrophic factor*) gehört zur Familie der Neurotrophine (NT), deren weitere Mitglieder NGF (*Nerve growth factor*) und NT-3 und NT-4/5 darstellen (Murer et al., 2001). Die komplexe Genstruktur von BDNF wurde bereits in Mensch und Nager vorgestellt (Liu et al., 2005; Aid et al., 2007). Mit einer Sequenzhomologie humanen BDNFs zu Schwein, Ratte und Maus (Hofer et al., 1990; Rosenthal et al., 1991; Murer et al., 2001) verbleibt die hBDNF-Struktur stärker konserviert als die Struktur von

NGF innerhalb der Entwicklung der Wirbelträger (Gotz et al., 1992; Gotz & Scharf, 1994). Dabei bilden die NT stabile, nicht-kovalente Homodimere (Jungbluth et al., 1994); deren Dimerisierung scheint für die Aktivierung von Tyrosinkinase-Rezeptoren (TrkA, TrkB, TrkC) wichtig zu sein (Murer et al., 2001). BDNF erfährt seine Expression durchweg im Gehirn, insbesondere in der hippocampalen Formation und im cerebralen Cortex (Murer et al., 2001). Das Precursor-Protein wird nach Generierung zur Proform (Pro-BDNF) zur maturen Form (BDNF) gespalten (Lessmann et al., 2003). Den Pro-NT ist eine proteolytische Furche für Furinartige Pro-Protein-Konvertasen gemein (Seidah et al., 1996; Murer et al., 2001). BDNF bindet mit hoher Affinität an TrkB mit der Folge dreier möglicher Signaltransduktionswege. Die Aktivierung über BDNF bewirkt eine Autophosphorylierung der Rezeptortyrosinkinase, welche 1) die Phospholipase C  $\gamma$  aktiviert und die Aktivität der Proteinkinase C erhöht, 2) über die Aktivierung der Phosphatidylinositolkinase-3 die Stimulation der Proteinkinase B steuert, 3) MAPK/ERK-Signalwege aktiviert, welche auf die Gentranskription wirken (Autry & Monteggia, 2012). Die Folge der Aktivierung dieser Signalwege durch BDNF führt zu einer Verbesserung der synaptischen Antwort und einem gesteigerten Zellwachstum und Überleben (Autry & Monteggia, 2012).

Eine Regulation erfährt BDNF durch verschiedene Faktoren, beispielsweise durch elektrophysiologische Stimulation (Patterson et al., 1992) oder infolge der Aktivierung von Glutamat-Rezeptoren (Zafra et al., 1990). Auch chronisches aerobes Training zeigte Effekte auf die Expression des BDNF. Erste Hinweise auf eine Trainings-induzierte Regulation des BDNF fanden sich in einer Studie von Neeper et al. (Neeper et al., 1996). Sprague-Dawley Ratten, die einem freiwilligen Lauftraining unterzogen wurden, zeigten bereits an Tag 2 eine signifikant erhöhte Expression von BDNF und NGF (Neeper et al., 1996). Eine positive Korrelation zwischen der erbrachten Laufdistanz und dem gemessenen BDNF-Anstieg in Hippocampus und kaudalem Cortex konnte in vorangegangenen Studien evaluiert werden (Neeper et al., 1995). Weitere Studien bestätigten die Trainings-induzierte BDNF-Hochregulation in Nagern (Adlard et al., 2004; Berchtold et al., 2005; O'Callaghan et al., 2007; Gomez-Pinilla et al., 2008). In einer Studie von Vaynman et al. wurden adulte Sprague-Dawley Ratten, die einem freiwilligen Trainingsregime von 1 Woche unterzogen wurden, hinsichtlich ihres Lern- und Erinnerungsvermögens im Morris Wasserlabyrinth getestet und nach Euthanasie der Versuchstiere wurde die mRNA-Expression von BDNF, TrkB und Marker synaptischer

Plastizität (Synapsin, CREB) bestimmt (Vaynman et al., 2004b). Es konnte eine signifikante Hochregulation der mRNA-Expression von BDNF, TrkB, Synapsin und CREB beobachtet werden, welche wiederum geblockt werden konnte durch Gabe des Fusionsproteins TrkB-IgG. Die Blockade der hippocampalen BDNF-Wirkung löschte ebenfalls den Effekt der Trainings-induzierten verbesserten Lernleistung und Erinnerung aus. Aus diesem Grund postulierten die Autoren einen BDNF-vermittelten Effekt über CREB und Synapsin auf die Trainings-induzierten kognitiven Effekte (Vaynman et al., 2004b). Neurotrophine wie BDNF werden als Modulatoren von Neuroplastizität und Zellüberleben mit Effekten auf das Lernen in Verbindung gebracht (Ahlskog et al., 2011).

### **1.2.4. Interaktion des neuronalen und vaskulären Systems**

Für BDNF ist beschrieben, dass seine Konzentration bei Patienten mit Alzheimer-Demenz drastisch absinkt (Christensen et al., 2008). Insofern liegt ein Einfluss des BDNF auf Neuroplastizität, Neurogenese und Lernen nahe. Den Hauptursprungsort des Neurotrophins stellen neben Neuronen und Gliazellen cerebrale Endothelzellen dar (Lange-Asschenfeldt & Kojda, 2008). Es gibt Hinweise darauf, dass die Trainings-induzierte Hochregulation des VEGF (Cotman et al., 2007) das Kapillarwachstum fördert, sowie die Endothelzellen zur Freisetzung neurogenetischer Faktoren wie BDNF stimuliert mit der Folge einer verbesserten Neuronendifferenzierung, eines gesteigerten Zellüberlebens und Axonenauswuchses (Carmeliet, 2003). Die These, dass das neuronale und vaskuläre System miteinander kommunizieren, wird zudem durch die Tatsache bekräftigt, dass cerebrale Endothelzellen in direkter Nachbarschaft zu Astrozyten als der Quelle für neurale Stammzellen existieren (Carmeliet, 2003; Lange-Asschenfeldt & Kojda, 2008).

Kardiovaskuläre Risikofaktoren (Hypertension, Diabetes, Hyperlipidämie, Rauchen) wurden assoziiert mit gesteigertem vaskulären oxidativen Stress und endothelialer Dysfunktion (Lange-Asschenfeldt & Kojda, 2008). Vaskulärer, oxidativer Schaden wurde assoziiert mit der Pathologie der Alzheimer-Erkrankung (Zhu et al., 2005; Zhu et al., 2007). In Patienten mit Alzheimer-Demenz wurde eine gesteigerte Oxidation und Nitrierung von Tyrosin- und Tryptophanresten gefunden (Zhu et al., 2005), welche einhergeht mit der Bildung von Peroxynitrit und Nitrotyrosinresten in Proteinen infolge oxidativem Stress (Francois & Kojda, 2004). Interessanterweise wurde für das A $\beta$ -Protein ein toxischer Effekt auf Endothelzellen sowie eine inhibitorische Wirkung auf die eNOS

nachgewiesen (Suhara et al., 2003), was in Hyperkontraktilität und verschlechterter Durchblutung resultierte (Lange-Asschenfeldt & Kojda, 2008). Körperliches Training wurde als die stärkste vasoprotektive, nicht pharmakologische Intervention beschrieben, unter anderem in der primären und sekundären Prävention von AD (Lange-Asschenfeldt & Kojda, 2008). Trainings-induzierte antioxidative und antiatherogene Effekte wurden in Verbindung gebracht mit Remodelling-Vorgängen und funktionellen Adaptationen (Kojda & Hambrecht, 2005). Es ist hinreichend belegt, dass die eNOS-Expression und deren Aktivierung über die Phosphorylierung des Serinrests an Position 1177 durch körperliches Training gesteuert wird (Kojda & Hambrecht, 2005). Vasoprotektive Effekte von NO wirken auch im cerebralen Gefäßsystem. In einer publizierten Studie wurden Mutanten im Serinrest-1179 boviner eNOS hinsichtlich ihrer vasoprotektiven Eigenschaften in einem Schlaganfallmodell transgener Mäuse untersucht. Das wesentliche Ergebnis dieser Studie brachte einen beeinträchtigten vasorelaxierenden Effekt der Mutante zum Vorschein, welche einen Austausch des Serinrestes durch nicht zu phosphorylierendes Alanin erfuhr. Zudem zeigte dieselbe Mutante eine gesteigerte Infarktgröße im Vergleich zum Wildtyp, die einherging mit einem signifikant verringerten Blutfluss infolge cerebraler Ischämie. Hingegen demonstrierte die phosphomimetische Form der eNOS eine stärkere vaskuläre Reaktivität und eine gesteigerte cerebrale Durchblutung (Atochin et al., 2007).

Es gibt Hinweise darauf, dass VEGF ebenfalls eine Serin-1177-Phosphorylierung der eNOS bewirkt sowie die Dephosphorylierung von Threonin-495 stimuliert (Mount et al., 2007). Aufgrund der regulatorischen Wirkung von VEGF auf die Freisetzung des BDNF wäre es möglich, dass die Trainings-induzierte eNOS-Aktivierung über BDNF zu den Effekten körperlichen Trainings auf Lernen und Gedächtnis beiträgt.

### 1.3. Fragestellungen

Das Ziel dieser Arbeit lag in der Bewertung von Strategien zur Behandlung von Demenzerkrankungen, beispielsweise *Morbus Alzheimer*.

Hierfür wurden eine pharmakologische und eine nicht-pharmakologische Intervention – körperliches Training - gewählt. Pharmakologisch wurde die Testsubstanz Vareniclin untersucht, welche aktuell eine Zulassung in Europa (Champix<sup>®</sup>) und USA (Chantix<sup>®</sup>) zur Behandlung der Raucherentwöhnung besitzt. Die hohe Bindungsneigung von Vareniclin zu  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR ( $K_i=0,1$  nM) (Rollema et al., 2007a) und der volle Agonismus zu  $\alpha_7$ -nAChR (Mihalak et al., 2006) – beide Subtypen von nAChR sind an kognitiven Prozessen beteiligt (Levin et al., 2006) – sprechen für eine mögliche promnestische Wirkung von Vareniclin. Bislang war die Datenlage zu prokognitiven Effekten der Substanz begrenzt. Aus diesem Grund wurden in dieser Dissertation Studien zum Einfluss von Vareniclin auf spezielle Formen kognitiver Funktionen *in vivo* durchgeführt. Kardiovaskuläre Risikofaktoren wurden ebenfalls als Risikofaktoren für die Entstehung einer Demenz definiert (Heyn et al., 2004). Da körperliches Training als die stärkste vasoprotektive, nicht-pharmakologische Intervention angesehen wird (Lange-Asschenfeldt & Kojda, 2008), lag es nahe, den Effekt körperlicher Aktivität auf die Gedächtnisleistung *in vivo* zu untersuchen. C57BL/6-Mäuse wurden hierfür einem körperlichen Trainingsprotokoll mit hoher Intensität zugeführt. Molekulare Untersuchungen auf Protein- und mRNA-Ebene dienten der Evaluation zugrunde liegender möglicher Mechanismen für die Vareniclin-vermittelten und Trainings-induzierten Effekte auf die Kognition.

Zurzeit verfügbare Therapieoptionen versprechen nur einen limitierten Erfolg bei der Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen. Aus diesem Grund sind beide therapeutischen Ansätze vor dem Hintergrund interessant, dass sie eine potenzielle pharmakologische Therapieoption bzw. nicht-pharmakologische, präventive Maßnahme bei Demenzerkrankungen, beispielsweise *Morbus Alzheimer*, darstellen könnten.

Auf Basis des oben dargestellten einleitenden Absatzes wurde folgende Fragestellung formuliert:

**Welche Strategien – pharmakologisch/nicht-pharmakologisch – induzieren prokognitive Effekte *in vivo* und welche molekularen Veränderungen liegen diesen zugrunde?**

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Puffer und Lösungen**

Chemikalien und organische Lösungsmittel wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (München), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Qiagen (Hilden) und Bio-Rad (München) bezogen.

#### **Lysispuffer für Mausschwanzspitzen, pH 8**

Tris 50 mM, EDTA 100 mM, NaCl 100 mM, SDS 1%

#### **50x Base Reagenz, pH 12**

NaOH 1,25 M, EDTA 10 mM

#### **50x Neutralisierungspuffer, pH 5**

Tris-HCL 2 M

#### **TAE-Puffer, pH 8**

Tris 40 mM, Essigsäure 0,1%, EDTA 10 mM

#### **TE-Puffer, pH 8**

Tris 10 mM, EDTA 1 mM

#### **10x TBE-Puffer**

Tris 890 mM, Borsäure 89 mM, EDTA 20 mM

#### **DNA-Auftragungspuffer**

Glycerin 50%, EDTA 50 mM, Bromphenolblau 0,1%  
ad 50 ml 10x TBE-Puffer

#### **Gewebe-Lysispuffer, pH 7,6**

Tris 5 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 2,5 mM, β-Glycerolphosphat 1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, NaF 5 mM, PMSF 1 mM, Proteaseinhibitoren (0,01g/ml Antipain, Aprotinin, Leupeptin, Benzamidin)

**Puffer für Membranpräparationen, pH 7,4**

Tris-HCL 150 mM, PMSF 2 mM, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, Proteaseinhibitoren (0,01g/ml Antipain, Aprotinin, Leupeptin, Benzamidin)

**Zell-Lysispuffer (RIPA-Lysispuffer)**

NaCl 150 mM, Tris-HCL 50 mM, NP-40 1%, SDS 0,1%

**Bradford-Reagenz**

Coomassie Brilliant Blue G 250 0,02%, Phosphorsäure 10% (V/V), Ethanol 5% (V/V)

**4x Sammelgelpuffer, pH 6,8**

Tris 250 mM, SDS 0,2%

**4x Trenngelpuffer, pH 8,8**

Tris 1,5 M, SDS 0,4%

**10x Laufpuffer, pH 8,6**

Tris-HCL 250 mM, Glycin 2 M, SDS 1%

**Western-Blot-Probenpuffer**

Tris 50 mM, Glycerol 10%, SDS 2%, Bromphenolblau 0,005%,  $\beta$ -Mercaptoethanol 15%

**TBST-Puffer, pH 7,6**

Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1% (V/V)

**Western-Blot-Puffer**

Tris 25 mM, Glycin 200 mM, Methanol 20% (V/V)

**Stripping-Puffer**

Tris 5 mM, SDS 2%,  $\beta$ -Mercaptoethanol 0,75%

### **Krebs-HEPES-Puffer, pH 7,4**

NaCl 99 mM, KCL 4,69 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,87 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25,0 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,03 mM, Na-Hepes 20 mM, Glucose 11,1 mM

### **Coomassie Gel-Färbung**

Stock 1: Coomassie Brilliant Blue G 250 0,2 %, Ethanol 90%

Stock 2: Essigsäure 20%

Fixierlösung: Ethanol 40%

Entfärbungslösung: Ethanol 20%, Essigsäure 10%, Aqua dest. 70%

## **2.2. Versuchstiere**

Entsprechend §8 des Tierschutzgesetzes vom 18. Mai 2006 wurden die nachfolgend beschriebenen Tierversuche vom Regierungspräsidium Düsseldorf genehmigt (AZ 8.87-51.04.20.09.383). Es wurden sowohl männliche C57BL/6-Mäuse, die in der zentralen Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf geboren wurden, als auch extern beschaffte, in spezifiziert pathogenfreien Bereichen (SPF) gehaltene Tiere von der Firma Janvier (Elevage Janvier, Le Genest St. Isle, Frankreich) verwendet. Die Zucht der transgenen Mauslinien erfolgte in der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf. Das Tierschutzgesetz wurde eingehalten nach Konvention. In allen Fällen lagen standardisierte Bedingungen vor (12stündiger Tag-Nacht-Rhythmus durch Kunstlicht, Raumtemperatur 20°C, relative Luftfeuchte 55°C ± 5%). Die Versuchstiere besaßen kontinuierlichen Zugang zu Standardfutter und entkeimtem Trinkwasser (pH 3) und standen zu jedem Zeitpunkt unter tierärztlicher Kontrolle. Nur die Tiere, die über einen einwandfreien körperlichen Zustand (Körpergewicht, Fell, Augen, Vibrissen) verfügten, wurden für nachfolgende Studien verwendet.

### **2.2.1. Fütterungsversuche**

Die in Kapitel 2.4.4. und 2.5.5. beschriebenen molekularbiologischen Untersuchungen (Western-Blot, Realtime-RT-PCR) wurden nach Behandlung von adulten, männlichen C57BL/6-Mäusen mit Vareniclin durchgeführt. Vareniclin (Vareniclintartrat, Pfizer, CP-526,555-18) wurde über den Zeitraum von 14 Tagen (21-28 Tage bei nachfolgenden

Kognitionsexperimenten) dem mit Saccharin (2%) angesüßten Trinkwasser (entkeimt, pH 3) in verschiedenen Tagesdosen (0,01, 0,1, 1, 3 mg/kg) zugesetzt. Aufgrund gruppeninterner Stabilitätsdaten war bekannt, dass in Wasser gelöstes Vareniclintartrat für 2 Wochen stabil ist.

### **2.2.2. Injektionsversuche**

Für die nachfolgenden Injektionsversuche wurde die Dosierung gewählt, die sich in den Fütterungsversuchen als die effizienteste gezeigt hatte. Vareniclin wurde in einer Tagesdosierung von 3 mg/kg in steriler Natriumchlorid-Lösung (0,9%; Braun) gelöst und über einen Zeitraum von 14 Tagen einmal täglich adulten C57BL/6-Mäusen injiziert. Dabei kam die intraperitoneale Applikationsart zum Einsatz (Nadel: Braun, 0,45x12mm). Mit den Kontrolltieren wurde ebenso verfahren, mit dem Unterschied, dass die Vareniclinlösung durch Vehikellösung (sterile Natriumchlorid-Lösung, 0,9%) ersetzt wurde. Zur Erfassung von Kognitionsdaten (s. **2.6.**) wurde Scopolamin (Scopolamin-Hydrobromid; Sigma, München) einmalig 90 Minuten vor Versuchsbeginn in einer Dosierung von 0,5 mg/kg intraperitoneal injiziert.

### **2.2.3. Trainingsversuche**

Mithilfe eines etablierten Trainingsprotokolls (Fukai et al., 2000; Kojda et al., 2001) wurden männliche C57BL/6-Mäuse (Jackson Laboratories, mittelalt) trainiert. In einer speziell angefertigten Laufradapparatur wurden vier Tiere gleichzeitig untersucht (s. **Abbildung 2.1**).



**Abbildung 2.1:** A Darstellung der Laufmaschine. B 4 C57BL/6-Mäuse liefen parallel in rotierenden Walzen der Laufmaschine.

Sowohl die Versuchstiere, die für das Lauftraining vorgesehen waren, als auch die Kontrolltiere wurden zuvor für mindestens 6 Wochen singularisiert. Dies geschah, um eine unterschiedliche Aktivität der Versuchstiere innerhalb ihrer sozialen Struktur zu vermeiden. Das Laufprotokoll sah eine 5tägige Adaptationsphase an das Training vor. Dabei wurde die Geschwindigkeit von anfänglich 5 m/min über 12 m/min gesteigert, bis die Tiere am fünften Tag eine Geschwindigkeit von 15 m/min über 30 min problemlos laufen konnten. An fünf Tagen über mindestens drei Wochen erfolgte nun das eigentliche körperliche Training über 450 m in 30 min. Die Käfige der ruhenden Kontrolltiere wurden neben das Laufrad positioniert, um alle Versuchsgruppen den gleichen Bedingungen auszusetzen (Trainingsraum, Geräuschkulisse). Im Anschluss an die letzte Trainingseinheit wurden die Versuchstiere in der Objektwiedererkennung getestet (s. 2.6.) oder innerhalb von 16-20 Stunden durch CO<sub>2</sub> Inhalation getötet (Kojda et al., 2001) (s. 2.2.5.). Zur Beurteilung der Trainingseffizienz dienten Körper-, Herz-, und Soleusmuskelgewicht, sowie die Tibiallänge, welche anhand eines Schiebeinstruments mit digitaler Anzeige (Tesa, Schweiz) ermittelt wurde. Der Nachweis einer Trainings-induzierten Herzhypertrophie erfolgte anhand der Berechnung des relativen Herzgewichts (HG<sub>rel</sub>) durch Standardisierung auf das Körpergewicht (KG) (HG<sub>rel</sub>: HG/KG) oder auf die Tibiallänge (TL) (HG<sub>rel</sub>: HG/TL). Die periphere Muskelzunahme wurde über das relative Soleusmuskelgewicht SG<sub>rel</sub> (SG<sub>rel</sub>: SG/KG; SG<sub>rel</sub>: SG/TL) in trainierten und ruhenden Kontrolltieren quantifiziert.

### 2.2.4. Transgene Tiere und deren Genotypisierung

Zwei transgene Tierlinien wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet. Es handelte sich hierbei zum einen um eine Mauslinie, deren endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) durch einen klassischen Knockout ausgeschaltet war (eNOS<sup>-/-</sup>). Dieser Knockout (Shesely et al., 1996) exprimiert keine eNOS; überprüft werden konnte dies durch das Fehlen der eNOS-Bande im Western-Blot (s. 2.4.4.). Eine zweite transgene Tierlinie wies eine erhöhte eNOS-Genexpression im Gefäßgewebe auf (Suvorava et al., 2005). Diese Überexpression entstand durch die Klonierung des bovinen eNOS-Abschnittes zwischen den Tie-2-Promoter und das Tie-2-Fragment (Oppermann et al., 2009). Der genetische Hintergrund wurde durch mindestens siebzehnfache Rückkreuzung transgen-positiver (eNOS<sup>+/+</sup>) Mäuse mit C57BL/6-Mäusen gesichert.

#### 2.2.4.1. Isolierung von genomischer DNA aus Biopsien der Maus

Genomische DNA wurde aus den Schwanzspitzen dreiwöchiger Versuchsmäuse isoliert. Hierfür wurde das Gewebe mit 750 µl Lysispuffer und Proteinase K (0,5 mg/ml; Qiagen) versetzt und über Nacht bei 56°C inkubiert. Mit einer 6 M NaCl-Lösung (250 µl) wurde der Ansatz für 5 min inkubiert und einer Zentrifugation bei 13000 rpm (15 min, RT) unterzogen. Der Zusatz von 500 µl absolutem Ethanol (-20°C) und eine nachfolgende Zentrifugation bei 13000 rpm für 30 min (4°C) dienten der Fällung der DNA. Nach Verwerfen des Überstandes folgte ein Waschschriff mit 750 µl kaltem Ethanol (70%); der anschließende Zentrifugationsschritt (5 min, 13000 rpm, 4°C) bezweckte die Abtrennung des Ethanols. Das Sediment wurde nach Trocknung in 80 µl TE-Puffer aufgenommen und über Nacht bei RT inkubiert. Am Folgetag wurde die DNA-Konzentration bei 260 nM mit dem Biophotometer<sup>®</sup> (Eppendorf, Hamburg) spektrophotometrisch bestimmt. Eine zweite Methode für die DNA-Isolierung („HotShot“) konnte modifiziert übernommen werden (Truett et al., 2000). Dafür wurden die Mausschwanzspitzen in 75 µl Base Lösung (s. 2.1.) aufgenommen und bei 98°C für 30 min bei 750 rpm geschüttelt. Nach Abkühlung auf 4°C wurde 75 µl Neutralisierungspuffer (s. 2.1.) hinzugefügt, danach für 3 min bei 4000 rpm zentrifugiert (4°C). Der Überstand wurde abgenommen und je 2 µl pro PCR-Ansatz verwendet.

### 2.2.4.2. Genotypisierung transgener Mäuse mittels PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) diente der Typisierung genomischer DNA. Primer wurden von der Firma MWG (Ebersberg) bezogen und hinsichtlich ihrer Spezifität ausgewählt. Das Primerpaar, welches zur Genotypisierung transgen-positiver Mäuse geeignet war, erfasste sowohl den Tie-2-Promoter (Sense-Primer) als auch bovine DNA (Antisense-Primer). Für die Untersuchung der Knockout-Tiere kamen zwei Primerpaare zum Einsatz, die die Neomycin-Kassette und den murinen eNOS-DNA-Abschnitt flankierten. Eine detaillierte Protokollbeschreibung einschließlich der verwendeten Primer und PCR-Bedingungen findet sich in **Tabelle 2.1**. Der PCR-Lauf erfolgte im `Mastercycler gradient` (Eppendorf, Hamburg).

Primer (5'→3')		
	eNOS <sup>-/-</sup>	eNOS <sup>+/+</sup>
<i>Sense</i>	<i>GCA TCA CCA GGA AGA AGA CC</i>	<i>GGG AAG TCG CAA AGT TGT GAG</i>
<i>Antisense</i>	<i>GAG CCA TAC AGA TGG TTG CC</i>	<i>GCT CCC AGT TCT TCA CGC GAG</i>
<i>Sense</i>	<i>CTC GAC GTT GTC ACT GAA GC</i>	
<i>Antisense</i>	<i>TCA AGA AGG CGA TAG AAG GC</i>	
<b>Reaktionsansatz</b>	50 µl	25 µl
Mastermix	20 µl	10 µl
Primermix	10 µl	10 µl
Mg <sup>2+</sup>	1 µl	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	18 µl	2,5 µl
DNA	1 µl	2 µl
PCR-Lauf		
Denaturierung	95°C, 3 min	95°C, 3 min
Denaturierung	94°C, 1 min	95°C, 1 min
Annealing	55°C, 1 min	57°C, 1 min
Elongation	72°C, 1 min	72°C, 2 min
Zyklen	35	35

**Tabelle 2.1:** Protokoll für die Genotypisierung der transgenen Mauslinien unter Auflistung der verwendeten Primer, Reaktionsansätze und PCR-Schritte. eNOS<sup>-/-</sup>: eNOS-Knockout-Tier; eNOS<sup>+/+</sup>: eNOS-überexprimierende Maus. Für die Knockout-PCR wurden zwei Primerpaare verwendet.

Ob die Primer das gewünschte Endprodukt amplifizierten, wurde durch elektrophoretische Auftrennung der Ansätze in 2%igen Agarosegelen analysiert. Dafür wurde Agarose in TAE-Puffer bei 100°C aufgeköcht und nachfolgend mit Ethidiumbromid (0,5 µl/ml) oder *Gelred Nucleic Acid Stain* (0,06 µl/ml; Biotium, Hayward) als Marker versetzt. Nach Begießen der Kammer (Bio-Rad, München) und Aushärten der Gele wurden eine 100Bp-Leiter (Invitrogen, Karlsruhe) sowie die Proben (1:1 Verhältnis mit DNA-Auftragspuffer) aufgetragen. Gewählte Elektrophoresebedingungen waren 90 V und 30 min; die Auswertung erfolgte bei 254 nm im UV-Transilluminator gegen die entsprechenden Kontrollen.

### **2.2.5. Präparation der Tiere und Entnahme der Organe**

Nach Beendigung der Fütterungs- (s. 2.2.1), Injektions- (s. 2.2.2), und Trainingsversuche (s. 2.2.3) wurden die Versuchstiere zwecks Organentnahme nach CO<sub>2</sub>-Inhalation auf einer eiskalten Präparationsunterlage fixiert. Nachfolgend wurde die Schädeldecke geöffnet und das gesamte Gehirn in eiskalten Krebs-Hepes-Puffer überführt. Die Präparation der nachfolgenden Gehirnabschnitte erfolgte unter dem Mikroskop. Zunächst wurden das Kleinhirn sowie der Hirnstamm isoliert. Entlang der longitudinalen Fissur wurden beide Hemisphären getrennt und medial platziert. Die Entfernung des Diencephalons ermöglichte die mediale Sicht auf den Hippocampus und dessen Freilegung. Der verbleibende Neocortex und der präfrontale Bereich wurden eingefroren.

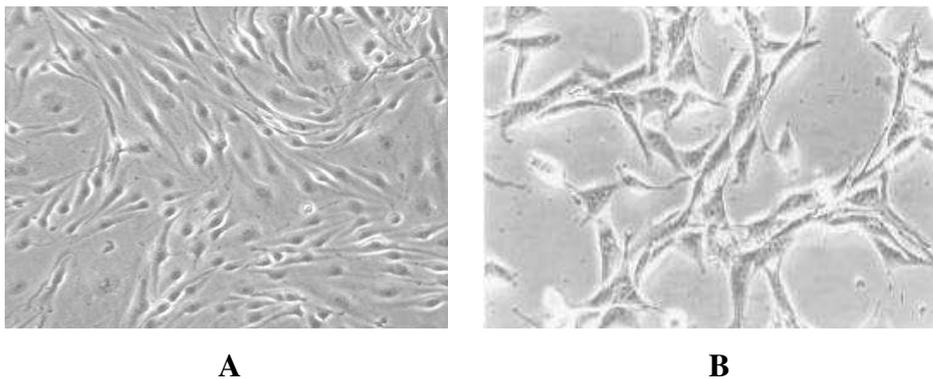
Zur Aortenisolierung wurde der Corpus sterni durchtrennt und zur Entfernung von Blut der rechte Herzventrikel durchspült (23G-Kanüle, 0,6mm, heparinisiert). Die thorakale Aorta wurde freigelegt durch Abtrennung der Lungenflügel und des Herzens. In-Krebs-Hepes-Puffer wurde die Aorta von umgebendem Gewebe vorsichtig befreit und durchspült. Die Isolierung des Soleusmuskels erfolgte nach Freilegung und Abtrennung des Musculus Gastrocnemius. Alle gewonnenen Organe wurden schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.3. Zellkulturexperimente

Zur Beantwortung der Fragestellung, ob die Agonist-induzierte Regulation der Untereinheiten des nikotinischen Rezeptors von neuronaler oder cerebraler Seite herrührte, wurden Inkubationsversuche mit Vareniclin an HT-22 und bEnd.3 Zellen durchgeführt.

#### 2.3.1. Kultivierung und Inkubationsversuche

Cerebrale Endothel- (bEnd.3) und hippocampale Zellen (HT-22) aus der Maus wurden in *Dulbecco's modified Eagle's Medium* (DMEM, Gibco, Karlsruhe) unter Zusatz von fetalem Kälberserum (FBS, Gibco, Karlsruhe) und Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories, Pasching) kultiviert und das Wachstum der Zellen im CO<sub>2</sub>-Inkubator (5%) bei 37°C unter dem Mikroskop observiert (s. **Abbildung 2.2**).



**Abbildung 2.2:** Kultivierung cerebraler Endothelzellen (bEnd.3) und hippocampaler Zellen (HT-22). **A** bEnd.3 Zellen. **B** HT-22 Zellen. Modifiziert entnommen (Zhang et al., 2003).

Nach Erreichen eines 70%-igen konfluenten Monolayers wurden die Zellen zweimal mit 10 ml PBS-Puffer (Gibco, Karlsruhe) gewaschen und mit Trypsin/EDTA (PAA Laboratories, Pasching) für 5 min inkubiert. Durch Zugabe einer äquivalenten Menge an Vollmedium wurde das Trypsin inaktiviert und die Zellsuspension bei 200×g zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in Vollmedium aufgenommen, auf 175 cm<sup>2</sup> Flaschen verteilt und mit frischem Medium komplettiert. Die Zellen wurden im Inkubator bei 37°C gehalten. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Inkubationen mit steril-filtrierte Vareniclinatrat oder mit PBS-Puffer in den Kontrollen durchgeführt.

Substanz	Zelllinie (Inkubationszeiten)		
	HT-22 (24 h)	HT-22 (48 h)	bEnd.3 (48 h)
Vareniclin		10 nM	10 nM
Vareniclin		100 nM	100 nM
Vareniclin	1 $\mu$ M	1 $\mu$ M	1 $\mu$ M
Vareniclin		100 $\mu$ M	

**Tabelle 2.2:** Inkubationen der HT-22 und bEnd.3 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Vareniclin (Pfizer, CP-526,555-18) über unterschiedliche Inkubationszeiten (24 h, 48 h).

## 2.4. Präparation und Analyse von Proteinen

Die Untersuchung der Proteinexpression erfolgte mittels Western-Blot (s. 2.4.4.). Dafür wurden zunächst Proteinfractionen transgener und nicht transgener Mauslinien (s. 2.2.4.) sowie Lysate aus neuronalen und endothelialen Zellkulturen hergestellt.

### 2.4.1. Proteinisolierung aus tierischem Gewebe

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Gewebe (Gehirn, Aorta) wurden in einem in Stickstoff gekühlten Metallzerkleinerer pulverisiert und sofort in eine adäquate Menge eisgekühlten Gewebelysispuffer aufgenommen. Zunächst wurde ein Gewebehomogenat gewonnen; je nach Lokalisation des zu untersuchenden Proteins erfolgte anschließend die Herstellung einer zytosolischen Fraktion.

#### 2.4.1.1. Herstellung eines Gewebehomogenats

Die in Lysispuffer aufgenommenen Organe wurden mittels eines Mikrogewebe Handhomogenisators (Neolab, Heidelberg) dispergiert und nachfolgend auf Eis für 10 Minuten bei 50 Hz beschallt. Zur Entfernung grober Gewebepartimente wurde das Lysat bei  $100\times g$  (10 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und das Pellet verworfen.

### **2.4.1.2. Isolation der zytosolischen Fraktion**

Zur Gewinnung zytosolischer Proteine wurde ein Teil des hergestellten Gewebehomogenats (s. **2.4.1.1.**) ein zweites Mal bei 20000×g (15 min, 4°C) zentrifugiert sowie eine weitere Stunde bei 105000×g (L-8 M Ultrazentrifuge mit Ti70-Rotor; Beckman, Krefeld).

### **2.4.2. Proteinisolierung aus endothelialen und neuronalen Zellen**

In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl mit bEnd.3 Zellen als auch mit HT-22 Zellen gearbeitet. Zur Proteinisolierung wurden die Zellen zweimalig mit 10 ml PBS (einfach, pH 7,4) gewaschen und mit einem Kratzer von der Flaschenunterseite vorsichtig abgelöst und einer Zentrifugation bei 200×g für 5 min unterzogen. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellsediment in 1 ml PBS aufgenommen und erneut bei 100×g (5 min, RT) zentrifugiert und bei -80°C gelagert. Je nach Herstellung eines Gesamtextraktes oder isolierter membranärer oder zytosolischer Fraktionen wurde im Folgenden unterschiedlich verfahren.

#### **2.4.2.1. Herstellung eines Gesamtextraktes**

Zur Herstellung von Gesamtexttrakten wurde nach Resuspendieren des Zellsedimentes mit RIPA-Puffer (s. **2.1.**) das Lysat für 20 min bei 4°C beschallt und anschließend zentrifugiert (100×g, 10 min). Der Überstand wurde abgetrennt. Trübe Suspensionen wurden einer erneuten Zentrifugation unterzogen.

#### **2.4.2.2. Isolierung der membranären Fraktion**

Die Herstellung membranärer Fraktionen erforderte eine Zentrifugation bei 20000×g (20 min, 4°C) in äquivalenten Mengen eines 150 millimolaren Tris-HCL-Puffers für Membranpräparationen (s. **2.1.**). Der folgende Schritt diente der Abtrennung der membranären Bestandteile von der zytosolischen Fraktion. Dafür wurde das zuvor gewonnene Sediment in RIPA-Puffer (s. **2.1.**) aufgenommen und für 20 min bei 4°C extrahiert. Es folgte eine abschließende Zentrifugation bei 20000×g (4°C, 20 min) und das Ausaliquotieren der Überstände.

### 2.4.3. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die quantitative Methode zur Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) misst die Zunahme der Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm proportional zur Proteinkonzentration. Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G-250 (Bio-Rad, München) erfährt nach Komplexbildung mit Proteinen eine Verschiebung seines Absorptionsmaximums von 470 nm auf 595 nm und eine Stabilisierung seiner anionischen, blauen Sulfonatform. Anhand einer Eichgeraden mit BSA als Kalibrierstandard (Sigma, München) in Konzentrationen von 10 µg/ml bis 140 µg/ml ließ sich die Konzentration verschiedener Proteinverdünnungen nach Vermessung im Spectrophotometer (DU 640 Spectrophotometer; Beckman, Krefeld) mittels linearer Regression bestimmen.

### 2.4.4. Western-Blot

Die Analyse der Proteinexpression in verschiedenen Geweben und Zelllysaten erfolgte mittels der Western-Blot-Methode. Man versteht hierunter die elektrophoretische Auftrennung eines Proteingemisches, den Transfer der Proteine auf eine Membran (Western-Blot) und eine nachfolgende Antikörperdetektion, beispielsweise durch Chemolumineszenz.

#### 2.4.4.1. Die diskontinuierliche SDS-PAGE

Das Verfahren der Polyacrylamid-Elektrophorese wurde 1970 von Laemmli zur denaturierenden, diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese ausgeweitet (Laemmli, 1970; Maizel et al., 1970). Diese Methode nutzt die polymerisierende Wirkung des Acrylamids. Eine Quervernetzung erfährt das Acrylamid durch N,N'-Methylenbisacrylamid; TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) und Ammoniumpersulfat sind Starter der Vernetzung. Die Gelmatrix wurde in Sammelgel und Trenngel unterteilt; das engporige Trenngel (7,5-12% Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1) wurde mit dem weitporigen Sammelgel (4,5% Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1) überschichtet, welches der gleichzeitigen Einwanderung der Proteingemische in das Trenngel diene. Je nach Größe des Proteins wurden 7,5-12% Acrylamid/Bisacrylamid-Gele mit einem pH von 8,8 verwendet. Sehr kleine Proteine mit einem Molekulargewicht von weniger als 18 kDa, beispielsweise BDNF, wurden in Mini Protean<sup>®</sup> TGX<sup>™</sup> Precast Gelen (4-20%; Bio-Rad)

aufgetrennt. Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefrorenen Proteinlysate wurden auf Eis aufgetaut, 1:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt, bei  $90^{\circ}\text{C}$  für 5 min hitzedenaturiert und in die Taschen des Sammelgels gefüllt. Ein farbmarkierter Protein-Größenstandard (Precision Plus, Bio-Rad, München) diente als Molekulargewichtsmarker. Der Gellauf erfolgte in einer Bio-Rad Elektrophoresekammer (Bio-Rad, München) bei 150 V. Klar voneinander abgrenzbare Banden erhält man nach Anlegung der Spannung, da die kleineren Proteinmoleküle die Maschen des gebildeten Netzwerkes schneller durchwandern können als Proteine größeren Molekulargewichtes.

### **2.4.4.2. Transfer der Proteine auf die Membran**

Der Proteintransfer der Tris-Glycin-Gele erfolgte in einer Blotting Apparatur (Bio-Rad, München) bei 100 V über 90 min in eiskaltem Western-Blotting-Puffer (s. **2.1.**). Geblottet wurde auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Porengröße  $0,45\ \mu\text{m}$ ; Millipore, Schwalbach), die zuvor mit Methanol angefeuchtet und aktiviert wurde.

### **2.4.4.3. Blocken unspezifischer Bindungsstellen**

Eine Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde durch eine Inkubation mit 6% Blockingmilch (6% Milchpulver in TBST-Puffer (s. **2.1.**)) für 1-3 h erreicht. Anschließend wurde dreimal mit TBST-Puffer für 5 min gewaschen.

### **2.4.4.4. Antikörperdetektion**

Die Detektion spezifischer Bindungsstellen erfolgte nach Antikörperinkubation bei  $4^{\circ}\text{C}$  über Nacht. Die Verwendung geeigneter Primärantikörper zeigt **Tabelle 2.3**. Nach einer Waschphase von  $4 \times 5$  min mit TBST-Puffer (s. **2.1.**) wurde mit Sekundärantikörpern (Anti-Maus (Bio-Rad, München); Anti-Kaninchen (Callbiochem, Darmstadt); Anti-Ziege (Santa-Cruz, Heidelberg)) (s. **Tabelle 2.4**) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Sekundärantikörper waren an eine Peroxidase gekoppelt. Nach erneutem viermaligem Waschen für je 5 min wurden die Membranen mit Lumi-Light Western Blotting Substrat (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) oder SuperSignal<sup>®</sup> West Dura (Pierce, Heidelberg) für 5 min inkubiert und das resultierende chemolumineszente

Signal wurde auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm<sup>TM</sup> ECL<sup>TM</sup>, Amersham, Freiburg) festgehalten. Zur Standardisierung auf eine Ladekontrolle und Auflösung der Antikörperbindung wurden die Membranen mit NaOH (0,2 M, 5 min) oder Stripping-Puffer (s. **2.1**, 50°C, 20 min) behandelt und nach Blockade unspezifischer Bindungsstellen mit Anti-Aktin- oder Anti-GAPDH-Antikörper inkubiert und wie oben beschrieben verfahren. Zur Auswertung der optischen Dichte der Banden wurde die Herstellersoftware Quantity One (Version 4.2.3.) (Bio-Rad, München) herangezogen. Dafür wurden die Filme mithilfe der Kamera eines Densitometers (Gel Doc<sup>TM</sup> 1000, Bio-Rad, München) fotografiert. Die Analyse der Proteinexpression erfolgte semi-quantitativ durch Normalisierung auf die Kontrolle (100%).

#### **2.4.4.5. Detektion des BDNF**

Zur Monomerisierung des BDNF-Dimers wurden die Proteinlysate in DTT (60 min, 70°C) gekocht und nachfolgend mit Probenpuffer auf 90°C für 5 min erhitzt (Marlatt et al., 2012). Der Gellauf erfolgte wie unter **2.4.4.1.** beschrieben in Mini Protean<sup>®</sup> Precast Gelen unter reduzierenden Bedingungen. Geblottet wurde auf eine Nitrocellulose-Membran (Porengröße 0,4 µm; Millipore, Schwalbach). Im Anschluss wurde die Membran oberhalb 30 kDa geschnitten. Die unspezifischen Bindungsstellen beider Membranen wurden durch eine einstündige Inkubation mit Odyssey<sup>®</sup> Blocking Puffer (Licor Biosciences, Bad Homburg) und PBS (1:1) abgesättigt. Der untere Membranabschnitt wurde mit Anti-BDNF-Antikörper, der obere Membranabschnitt mit Anti-Tubulin- oder Anti-Aktin-Antikörper über Nacht inkubiert. Am Folgetag erfolgte ein viermaliger Waschschrift mit PBST. Anschließend wurden die Membranen mit Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpern (Licor Biosciences, Bad Homburg; s. **Tabelle 2.4**) im Dunkeln bei RT inkubiert. Der einstündigen Inkubation folgten vier Waschschriffe à 5 min in PBST. Zur Entfernung von verbleibendem Tween 20 wurden die Membranen anschließend mit PBS gewaschen. Nach Auflegen der Membranen auf die Messplatte des Licor Odyssey<sup>®</sup> und Auswahl des geeigneten Fluoreszenzkanals wurde die Fluoreszenz mithilfe des Licor Odyssey<sup>®</sup> Fluoreszenzscanners detektiert. Die Quantifizierung der Proteinexpression erfolgte anhand der Application Software Version 3.0 (Licor Odyssey<sup>®</sup>, Licor Biosciences). Nach Vermessung wurden die Membranen in PBST aufbewahrt.

Anti- $\alpha_4$ (pAB)	1:1000	Ziege	Abcam, Cambridge
Anti- $\beta_2$ (pAB)	1:1000	Ziege	Abcam, Cambridge
Anti-Aktin (pAB)	1:5000	Kaninchen	Sigma, München
Anti-GAPDH (mAB)	1:8000	Maus	Sigma, München
Anti-eNOS (mAB)	1:1000	Maus	BD Transduction, Heidelberg
Anti-BDNF (pAB)	1:1000	Kaninchen	Millipore, Schwalbach
Anti-Tubulin (mAB)	1:5000	Maus	Sigma, München

**Tabelle 2.3:** Verdünnungen der Erstantikörper zur Detektion im Western-Blot. pAB: polyklonaler Antikörper, mAB: monoklonaler Antikörper.

Anti-Ziege	1:6000	Esel	Santa-Cruz, Heidelberg
Anti-Kaninchen	1:8000	Ziege	Callbiochem, Darmstadt
Anti-rabbit IRDye <sup>®</sup> 800CW	1:10000	Ziege	Licor Biosciences, Bad Homburg
Anti-Maus	1:6000	Ziege	Bio-Rad, München
Anti-mouse IRDye <sup>®</sup> 680LT	1:10000	Ziege	Licor Biosciences, Bad Homburg

**Tabelle 2.4:** Verdünnungen der Sekundäntikörper

## 2.5. Präparation und Analyse der RNA

Erster Schritt für die Untersuchung der mRNA-Expression war die Isolierung der RNA aus RNA-Later<sup>®</sup> stabilisierten Proben von tierischem Gewebe (s. 2.5.1.) oder Zellen (s. 2.5.2.).

### 2.5.1. RNA-Isolierung aus tierischem Gewebe

RNA wurde aus Geweben des Hippocampus und des Neocortex von der Maus isoliert. Die in RNA-Later<sup>®</sup>-Lösung eingefrorenen Cortexproben wurden in eiskaltem Lysispuffer (1%  $\beta$ -Mercaptoethanol in RLT<sup>®</sup>-Lysispuffer) mithilfe des Ultra-Turrax (nur RNA; T8, Ika Labortechnik, Staufen) homogenisiert. Aufgrund der geringen Hippocampusmenge wurden Hippocampi einer Versuchstiergruppe zusammengefasst und mit einem Mikrogewebe Handhomogenisator (nur RNA; Neolab, Heidelberg) in Lysispuffer (1%  $\beta$ -Mercaptoethanol in RLT<sup>®</sup>-Lysispuffer) vorsichtig homogenisiert. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden der Ultra-Turrax und der Handhomogenisator zwischen den unterschiedlichen Proben mit NaOH (0,1 %) und Nuklease-freiem Wasser gereinigt.

Die Isolierung der RNA aus Cortex- und Hippocampiprüben erfolgte mithilfe des RNeasy<sup>®</sup> Mini Kits (Qiagen, Hilden). Dafür wurden die in Lysispuffer (RLT<sup>®</sup>-Puffer und  $\beta$ -Mercaptoethanol) aufbereiteten Homogenate auf QIAshredder<sup>®</sup>-Säulen überführt. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei 13000 rpm wurde der gesamte Überstand abgenommen. 590  $\mu$ l Nuklease-freies Wasser und 10  $\mu$ l Proteinase K (Qiagen, Hilden) wurden dem RNA-enthaltenden Überstand für 10 min bei 50°C hinzugegeben. Die Zugabe einer äquivalenten Menge an 70% (V/V) Ethanol zum Überstand diente der Ausfällung der RNA. Nachfolgend wurden die Homogenate auf RN<sup>®</sup>easy Säulen überführt. Die anschließende Zentrifugation bei 10000 rpm diente der Bindung der gefällten RNA an der Säule, die anschließend durch Zugabe von 350  $\mu$ l RW1-Puffer (RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit) und Zentrifugation (10000 rpm, 1 min) gewaschen wurde. Im Anschluss erfolgte eine DNase-Behandlung zur Vermeidung von DNA-Kontaminationen in der RNA-Probe. Die Komponenten der DNase-Behandlung wurden durch ein separates Kit (RNase-Free DNase Set, Qiagen, Hilden) bereitgestellt. Nach Zusatz von 80  $\mu$ l DNase-Mix (10  $\mu$ l DNase + 70  $\mu$ l RDD-Puffer, Qiagen, Hilden) und einer 15minütigen Inkubation wurde die auf der Säule haftende RNA einmal mit 350  $\mu$ l RW1-Puffer und zweimal mit 500  $\mu$ l RPE-Puffer gewaschen (Mini RNeasy<sup>®</sup> Kit) und zentrifugiert (10000 rpm, 1 min). Als letzter Schritt erfolgte die Elution der RNA mit 30  $\mu$ l Nuklease-freiem Wasser (Ambion, Darmstadt) und eine Zentrifugation bei 10000 rpm (1 min, RT).

### **2.5.2. RNA-Isolierung aus endothelialen und neuronalen Zellen**

Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (Qiagen, Hilden) aus Tumorzellen des Hippocampus (HT-22) und cerebralen Endothelzellen der Maus (bEnd.3). HT-22 und bEnd.3 Zellen wurden bis zu einer 80-90%-igen Konfluenz kultiviert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Nach Absaugen des Mediums und zweimaligen Waschen mit PBS (Gibco, Karlsruhe) wurde 350  $\mu$ l eiskalter Lysispuffer (RLT<sup>®</sup>-Puffer und  $\beta$ -Mercaptoethanol) hinzugegeben. Im Folgenden wurden die Zellen mit der Pipette resuspendiert und von der Flaschenunterseite abgekratzt (Zellkulturschaber; Neolab, Heidelberg). Die Zellsuspension wurde in ein Falcon<sup>®</sup> (Eppendorf, Hamburg) überführt und wiederholt resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension auf QIAshredder<sup>®</sup> Säulen (Qiagen, Hilden) überführt und für 2 min zentrifugiert (13000 rpm, RT). Zur Fällung der RNA wurde der Überstand mit 350  $\mu$ l 70% Ethanol versetzt und wiederholt resuspendiert. Der gesamte

Überstand wurde auf RNeasy<sup>®</sup> Säulen gegeben und für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die RNA ist jetzt auf der Säule gebunden und kann in nachfolgenden Schritten mit DNase Mix (10 µl DNase + 70 µl RDD-Puffer) inkubiert und mit RW1-Puffer und RPE-Puffer gewaschen und zentrifugiert (13000 rpm, 1 min) werden. Die Elution der RNA erfolgte mit 30 µl Nuklease-freiem Wasser (Ambion, Darmstadt) und einer Zentrifugation bei 13000 rpm (1 min, RT).

### **2.5.3. RNA-Konzentrationsbestimmung**

Die Messung der RNA erfolgte in einem Nanospect<sup>®</sup> Photometer (Peqlab Biotechnologie, Erlangen), das die Verwendung minimaler Mengen RNA erlaubte. Dabei wurde die Absorption bei 260 und 280 nM zur Bestimmung der RNA-Konzentration in der Probe herangezogen. Der OD 260/280 Quotient diente als Richtwert für die Güte der RNA-Isolierung. Nach Vermessung wurde die Probe verworfen.

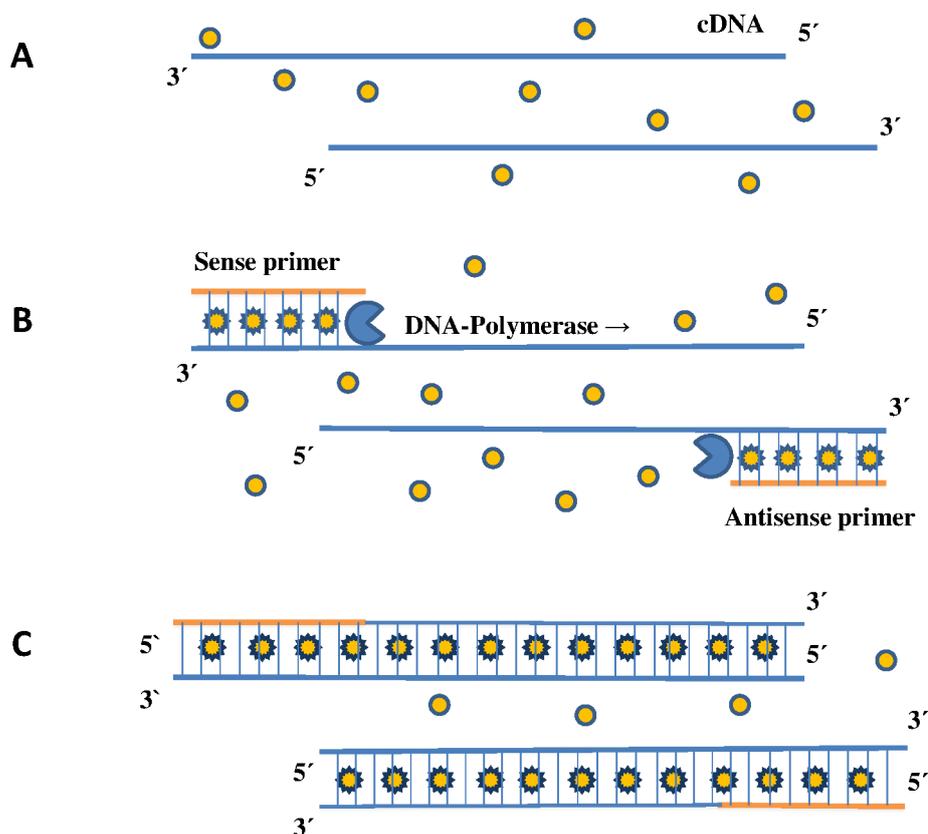
### **2.5.4. cDNA-Synthese**

Die Synthese der komplementären cDNA erfolgte nach Isolierung der RNA (s. **2.5.1.**, **2.5.2.**). Für die reverse Transkription wurde ein kommerziell erhältlicher Kit eingesetzt (RevertAid<sup>™</sup> H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas) und nach Herstellerangaben durchgeführt. Im Genauen wurden 1 µg RNA mit 1 µl Oligo(dT)<sub>18</sub> Primer gemischt und mit DEPC-behandeltem Wasser auf 12 µl aufgefüllt. Nach Durchmischung und Zentrifugation erfolgte eine Inkubation bei 65°C für 5 min; im Anschluss wurden die Proben auf Eis gekühlt (1 min) und erneut zentrifugiert. 8 µl Mastermix (4 µl 5x Reaktionspuffer, 1 µl RiboLock<sup>™</sup> RNase Inhibitor (20 u/µl), 2 µl dNTP Mix (10 mM), 1 µl RevertAid reverse Transkriptase (200 u/µl)) wurden dem Ansatz hinzugefügt und gemischt. Es folgte eine Inkubation für 60 min bei 42°C. Die Reaktion wurde bei 70°C (5 min) gestoppt. Die erhaltene cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.5.5. Realtime-RT-PCR

#### Theorie

Die Quantifizierung transkribierter mRNA der  $\alpha_4$ - bzw  $\beta_2$ -Untereinheit des nAChR erfolgte mittels der Realtime-Reverse-Transkriptions-PCR (RT-PCR). Als Ausgangsstrang diente die unter **2.5.4.** hergestellte cDNA. Primer wurden mithilfe der Software „Primer3“ (<http://frodo.wi.mit.edu/>) ausgewählt und von MWG (Ebersberg) geordert. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde SYBR<sup>®</sup>Green verwendet, welches zwischen neugebildete doppelsträngige Nucleinsäuren interkaliert. Das Prinzip dieser quantitativen Messmethode beruht auf dem exponentiellen Anstieg des Fluoreszenzsignals bei Zunahme neugebildeter Nucleinsäuren (s. **Abbildung 2.3**).



**Abbildung 2.3:** Schematische Darstellung des RT-PCR-Prinzips mit dem SYBR<sup>®</sup>Green Assay (Peqlab, Erlangen)

**A** Denaturierung: bei 94°C erfolgt die Denaturierung beider Doppelstränge zu Einzelsträngen. **B** Annealing und Elongation: Primer lagern sich komplementär an und die DNA-Polymerase verlängert den cDNA-Abschnitt mit komplementären Basenpaaren. **C** SYBR<sup>®</sup>Green lagert sich zwischen neugebildete doppelsträngige DNA und es resultiert ein exponentiell steigendes Fluoreszenzsignal.

Die Evaluierung der mRNA-Expression der  $\alpha_4$ - und  $\beta_2$ -Untereinheiten des nAChR erfolgte in Cortex- und Hippocampiprüben euthanasierter Mäuse, sowie in murinen hippocampalen und endothelialen Zellen. Zusätzlich erfolgte eine Standardisierung auf ein Haushaltsprotein (GAPDH). **Tabelle 2.5** gibt den Versuchsaufbau von RT-PCR-Experimenten einschließlich der Reaktionsansätze, Primer und PCR-Bedingungen wieder. Ob die Primer das gewünschte Endprodukt amplifizierten, ließ sich durch elektrophoretische Auftrennung der Ansätze in 2%igen Agarosegelen analysieren.

<b>Primer (5'→3')</b>		
	AchR $\alpha_4$	AchR $\beta_2$
<i>Sense</i>	<i>CGG CCA GTA GCC AAT ATC TC</i>	<i>GGG AAG ATT ATC GCC TCA CA</i>
<i>Antisense</i>	<i>CAC GTT GGT CGT CAT CAT CT</i>	<i>TGC CGT CAG CAT TGT TGT AT</i>
Amplikon	105 Bp	117 Bp
<b>Reaktionsansatz</b>	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l
Sybr <sup>®</sup> Green Mastermix	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
Primermix (je 500 nM)	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l
cDNA	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
RNA freies Wasser	7 $\mu$ l	7 $\mu$ l
<b>Realtime-PCR-Lauf</b>		
Hot Start	95°C, 15 min	95°C, 15 min
Denaturierung	94°C, 15 s	94°C, 15 s
Annealing	62°C, 30 s	62°C, 30 s
Elongation	72°C, 30 s	72°C, 30 s
Zyklen	40	40

**Tabelle 2.5:** Verwendete Primer, Reaktionsansätze und Bedingungen des PCR-Laufs bei der Durchführung von Realtime-PCR-Experimenten. Primersequenzen sind von 5' zu 3' beschrieben. Für GAPDH wurde ein Kit (Mm\_GAPDH\_3SG; Qiagen, Hilden) verwendet.

Die ermittelten Daten wurde mittels der 7300 System Sequence Detection Software, Version 1.2.3. (Applied Biosystems, Weiterstadt) analysiert. Zur Berechnung wurde die  $\Delta\Delta$ Ct-Methode angewandt. Der Ct-Wert (*Cycle of threshold*) entspricht dabei dem Zeitpunkt oder Zyklus, bei welchem zum ersten Mal messbare cDNA-Konzentrationen erscheinen. Dieser wird umso schneller erreicht, je mehr RNA von Beginn an vorhanden ist und je weniger Amplifizierungszyklen benötigt werden. Zur Standardisierung der Zielgene wurde eine endogene Kontrolle mitgeführt. Als interner Standard wurde ein

Referenz- oder auch Haushaltsgen ausgewählt, welches sich durch eine konstitutiv exprimierte Transkriptmenge charakterisierte. Zur Normierung der Transkriptionsrate der Zielgene wurde deren Ct-Wert auf den Ct-Wert der endogenen Kontrolle bezogen:

$$1. Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{Referenzgen}} = \Delta Ct$$

Die Genexpression der  $\alpha_4$ - und  $\beta_2$ -Untereinheiten des nAchR wurde auf die Expression des Haushaltspoteins GAPDH normiert. Aus den ermittelten  $\Delta Ct$ -Werten der Versuchsgruppen wurde der  $\Delta\Delta Ct$ -Wert gebildet.

$$2. \Delta Ct_{\text{Behandelte Probe}} - \Delta Ct_{\text{Kalibrator}} = \Delta\Delta Ct$$

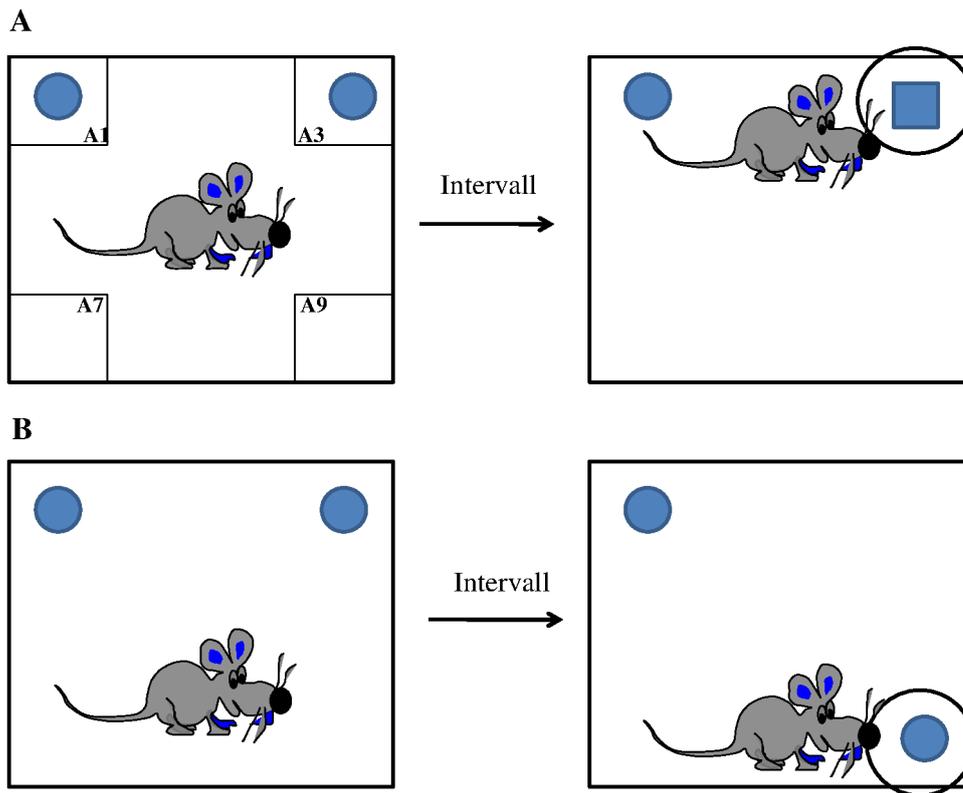
Die Berechnung des relativen Expressionsunterschieds gelang nach Einsatz in die Formel von Livak und Schmittgen (Formel 3) (Livak & Schmittgen, 2001). Der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Wert veranschaulicht das Vielfache der Transkriptionsmenge des untersuchten Gens in der behandelten Probe gegenüber der Kontrollgruppe.

$$3. \text{Relative Expression} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

### 2.6. Untersuchungen zur kognitiven Funktion: Objektwiedererkennung

#### Theorie

Die Objekterkennung basiert auf dem *Novelty Preference Paradigm* (Dere et al., 2007) von Nagern und misst deren spontanes Verhalten gegenüber von Objekten. Die Objektwiedererkennung erfasste die Erkundungszeit am Objekt in zwei Versuchsdurchgängen über 10 min. In einem ersten Versuchsdurchgang wurden den Nagern zwei identische Objekte dargeboten; es folgten ein Verzögerungsintervall und eine zweite Testphase, in welchem eines der vertrauten Objekte durch ein neues ausgetauscht wurde (s. **Abbildung 2.4 A**).



**Abbildung 2.4:** Schematische Zeichnung der verschiedenen Varianten des *Novelty Preference Paradigm* (Dere et al., 2007)

**A** Objektwiedererkennung: im Falle einer Objektwiedererkennung erkundet die Maus das eckige Objekt während der Testphase verstärkt. **B** Räumliches Objektgedächtnis: im Falle einer räumlichen Objektwiedererkennung erkundet die Maus das Objekt in der veränderten Position während der Testphase verstärkt. Die Zirkel verdeutlichen die höhere Explorationszeit am jeweiligen Objekt bei Wiedererkennung. Modifiziert entnommen (Dere et al., 2005). Zur randomisierten Verteilung der Objekte wurden die Ecken mit den Bezeichnungen A1, A3, A7, A9 beschriftet.

Nagetiere explorieren eine unbekannte Umgebung oder nicht vertraute Objekte anhand ihrer visuellen und taktilen Eigenschaften. Physischer Kontakt am Objekt, beispielsweise mit der Schnauze oder den Vorderpfoten durch Aufrichten am Gegenstand, induziert bei wiederholter Objektpräsentation dessen Wiedererkennung. Dies geht mit einer Abnahme der Explorationstätigkeit am familiären Objekt einher. Hingegen werden unbekannte Objekte in der Regel von Nagern länger exploriert (Mumby et al., 2002; Dere et al., 2005). Eine Möglichkeit der Erfassung einer potentiell verbesserten Diskriminationsleistung nach Intervention (Pharmaka, körperliches Training) besteht darin, Verzögerungsintervalle zu nutzen, nach welchen die Kontrolltiere keine Wiedererkennung aufweisen. In vorangegangenen Studien demonstrierten C57BL/6-Mäuse innerhalb einer Stunde nach erstmaliger Objektpräsentation eine Diskriminationsleistung zwischen dem neuartigen und

bekanntes Objekt (Dodart et al., 1997; Bertaina-Anglade et al., 2006). Wir testeten ein Intervall von 50 min zur Abfrage der Objektwiedererkennung. Im Allgemeinen nimmt die Diskriminationsleistung mit zunehmender Länge des Verzögerungsintervalls zwischen beiden Versuchsdurchgängen ab (Dere et al., 2007). 1-2 h (Bertaina-Anglade et al., 2006) bzw. 1-4 h nach erstmaliger Objektpräsentation in Abhängigkeit der verwendeten Mauslinie (Sik et al., 2003) verloren Mäuse ihre Fähigkeit zur Objekterkennung. Aus diesem Grund wurde in nachfolgenden Studien das Intervall von 50 min auf 3 h ausgeweitet. Ein zweites stark verkürztes Intervall von 10 min wurde ebenfalls testweise angewendet.

Alternativ zur Testung promnestischer Substanzen bei verschiedenen Retentionsintervallen können deren Effekte auf eine Scopolamin-induzierte beeinträchtigte Kognition beurteilt werden (de Bruin & Pouzet, 2006; Botton et al., 2010; Han et al., 2012). Scopolamin wird als Standardsubstanz zur Generierung einer „cholinergen Amnesie“ verwendet (Klinkenberg & Blokland, 2010). Die Substanz wurde hinsichtlich ihrer amnestischen Wirkung in einer Reihe von kognitiven Aufgabenstellungen getestet, unter anderem in der Objekterkennung (Dodart et al., 1997; Bertaina-Anglade et al., 2006; de Bruin & Pouzet, 2006; Botton et al., 2010). Eine Abwandlung des *Novelty Preference Paradigm* (Dere et al., 2007) erfasst das Vermögen der Nagetiere, Änderungen der räumlichen Anordnung von Objekten zu erfassen (räumliches Objektgedächtnis). Hier wurde keines der Objekte ausgetauscht, sondern die Platzierung eines der Objekte im Offenfeld verändert (s. **Abbildung 2.4 B**). Falls die Tiere das Objekt in der neuen Position präferentiell erkunden, weist dies auf Wiedererkennung des Objektes in der bekannten Position hin (Dere et al., 2005; Dere et al., 2007). Der Unterschied zur Objektwiedererkennung besteht darin, dass diese in erster Linie über corticale Strukturen vermittelt wird (Barker et al., 2007). Hingegen wurde für den Hippocampus eine bedeutsame Rolle bei räumlichen Gedächtnisleistungen postuliert (Winters et al., 2004). Aus diesem Grund ermöglichte die Erfassung beider Aspekte der Objektwiedererkennung die Beurteilung beteiligter Strukturen an den kognitiven Effekten von Vareniclin.

### 2.6.1. Versuchstiere und Adaptation

Alle Versuchstiere wurden eine Woche vor Versuchsbeginn ausgeinzelt. Für Trainingstiere galt eine 6wöchige Auseinzelung vor Trainingsbeginn. Es kamen nur die Tiere zum Einsatz, die einen guten Gesundheitsstatus aufwiesen, erkennbar an Fell, Körpergewicht, Augen und Vibrissen. Über einen Zeitraum von 7 Tagen wurden die Tiere jeden Tag in den Versuchsraum überführt, in welchem sie eine Adaptation an die Hand erfuhren. Zur Gewöhnung an das Offenfeld wurden sie an drei aufeinanderfolgenden Tagen für 10 min in die Apparatur gesetzt. Am Folgetag wurde die Objektwiedererkennung während der Hellphase getestet. Für die Generierung einer Pharmakon-induzierten beeinträchtigten Kognition wurde Scopolamin 90 min vor Versuchsbeginn in einer Dosierung von 0,5 mg/kg intraperitoneal injiziert. Die Auswahl der Dosis ergab sich aus Literaturbefunden, welche eine amnestische Wirkung von Scopolamin in Dosen von 0,3-1 mg/kg in Mäusen unter Anwendung eines einstündigen Retentionsintervalls in der Objektwiedererkennung demonstrierten (Bertaina-Anglade et al., 2006).

### 2.6.2. Apparatur und Objekte

Die Experimente zur kognitiven Funktion wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für experimentelle Psychologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Dabei stellte Frau Dr. Sandra Schäble eine Ansprechpartnerin bei Fragen zur Durchführung und Auswertung von Offenfeldexperimenten dar.

Wir benutzten ein quadratisches Offenfeld mit einer 30x30x40 cm großen Fläche aus grauem PVC (s. **Abbildung 2.5**). Zur Unterscheidbarkeit der Wände und zur räumlichen Orientierung der Versuchstiere wurden an gegenüberliegenden Seiten farbliche Markierungen angebracht. Zur Maskierung akustischer Störungen diente ein konstantes Hintergrundrauschen. Oberhalb des nach oben geöffneten Offenfeldes wurde eine Videokamera positioniert, die den Versuchshergang dokumentierte. Zusätzlich wurde das Offenfeld bei einer Beleuchtungsstärke von 18 Lux gleichmäßig in den Ecken der Box ausgeleuchtet. Die gewählten Objekte bestanden aus demselben Material (Plastik), um eine eventuelle Präferenz gegenüber einem bestimmten Material zu vermeiden. Außerdem besaßen sie eine unterschiedliche Größe, Farbe, Form und Oberflächenbeschaffenheit.

Nach jedem Durchgang wurde die Apparatur (Offenfeld und Objekte) mit 75% Ethanol gesäubert.

Pilotstudien wurden durchgeführt, die zeigten, dass die Tiere in der Lage waren, nach einem geeigneten Verzögerungsintervall zwischen den beiden Objekten zu diskriminieren. Zudem zeigten die Versuchstiere keine *per se* Präferenz zu einem der beiden Objekte oder zu einer der Ecken des Offenfeldes (s. 3.1.3.1.1.)



**Abbildung 2.5:** Apparatur des Offenfeldes

Gemessen wurden die Explorationszeiten am Objekt (in s) in beiden Versuchsdurchgängen und die Lokomotion. Dabei wurde eine mindestens 10sekündige Explorationszeit am Objekt vorausgesetzt. Zur Auswertung wurden die Explorationszeiten (Zweifach-Bestimmung) und ein Diskriminationsindex (DI) herangezogen, der die Gesamtexplorationszeit an beiden Objekten berücksichtigte. Dieser Diskriminationsindex wurde auf Basis der Studien von Mumby et al. (Mumby et al., 2002) und Botton et al. (Botton et al., 2010) ausgewählt.

Dabei gilt:

DI: Explorationszeit (neuartiges Objekt)/Explorationszeit (neuartiges + bekanntes Objekt)

Die Bestimmung der Lokomotion erfasste die Aktivität der Versuchstiere innerhalb des Offenfeldes. Das Offenfeld wurde hierfür in 9 Quadrate gleicher Größe eingeteilt. Die Anzahl der Linienübertretungen mit allen 4 Pfoten definierte die Lokomotion.

### **2.7. Statistik**

Die statistischen Auswertungen erfolgten mittels der Computersoftware Graph Pad Prism<sup>®</sup>, Version 5.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Die Ergebnisse der molekularbiologischen und funktionellen Versuchsreihen sind als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (MW  $\pm$  SEM) ausgedrückt. Dabei charakterisiert n die Anzahl der Einzelversuche. Der Vergleich zweier oder mehrere Tiergruppen erfolgte mit einem ungepaarten, zweiseitigen Student's t-Test bzw. einer einfaktoriellen Varianzanalyse mit nachfolgendem Newman-Keuls Post-Test (One-way ANOVA). Ein P-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant beurteilt. Bei einem intraindividuellen Vergleich einer Studiengruppe wurde der gepaarte Student's t-Test zu Hilfe genommen.

Die Explorationszeiten in beiden Versuchsdurchgängen der Objektwiedererkennung wurden mittels eines gepaarten Student's t-Test miteinander verglichen. Für einen statistischen Vergleich der Diskriminationsfaktoren zu 0,5 wurde der One-sample t-Test herangezogen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Effekte von Vareniclin

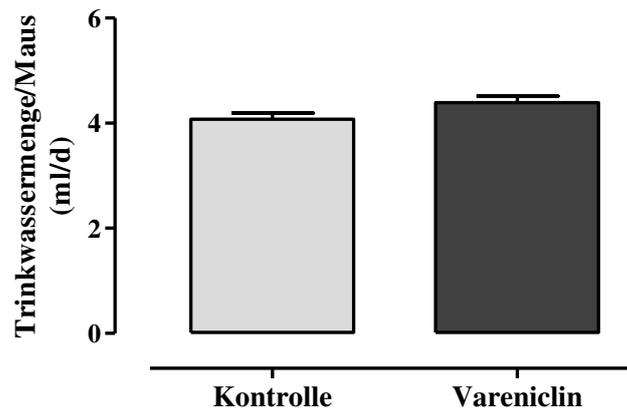
Cholinerge Signalwege sind für kognitive Prozesse über die Aktivierung von Acetylcholinrezeptoren von Bedeutung (Everitt & Robbins, 1997). Klassischerweise bewirkte die Stimulation mittels Rezeptoragonisten einen regulatorischen „Knock-down“ des angesprochenen Rezeptors. Vareniclin bindet partiell agonistisch an  $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptoren, mit der Folge einer gesteigerten [ $^3\text{H}$ ]Epibatidinbindung zu heterologen nAChR (Turner et al., 2011). Jedoch existierten bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Belege über eine spezifische Regulation der Untereinheiten des  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR durch Vareniclin. In der folgenden Studie wurde untersucht, ob Vareniclin über eine Regulation der Untereinheiten dieses nAChR-Subtyps verbesserte kognitive Effekte ausübte. Die Beantwortung dieser Fragestellung könnte einen potenziellen Therapieansatz von Vareniclin bei dementiellen Erkrankungen, beispielsweise *Morbus Alzheimer*, ermöglichen.

##### 3.1.1. Untersuchungen zum Effekt von Vareniclin *in vivo*

###### 3.1.1.1. Validierung einer Vareniclin-Trinklösung

Da bislang kein etabliertes Modell für die orale Verabreichung von Vareniclin existierte, wurden adulte C57BL/6-Mäuse einer mehrwöchigen Verabreichung von Vareniclin über das Trinkwasser ausgesetzt. Mit einer bekannten Halbwertszeit von 1,4 h und einer  $t_{\text{max}}$  von 1 h in Mäusen (Obach et al., 2006) wurde die Substanz für 14 Tage oder 21-28 Tage bei nachfolgender Kognitionsmessung wie beschrieben verabreicht (s. **2.2.1.**). Aufgrund interner Untersuchungen zur Stabilität von Vareniclin war bekannt, dass Vareniclin in wässriger Lösung für mindestens 2 Wochen stabil ist. Um eine Applikation über das Trinkwasser zu gewährleisten, wurden die Trinklösungen mit Saccharin (2%) gesüßt.

Der Austausch des Trinkwassers durch frisch hergestellte Vareniclin-Trinklösung wurde alle 3 Tage vorgenommen und die aufgenommene Trinkwassermenge ermittelt (s. **Abbildung 3.1**). Nach Berechnung der individuellen täglichen Trinkwassermenge pro Maus konnte eine durchschnittliche Trinkwassermenge der Tiere von  $4,076 \pm 0,12$  ml/Tag in der Kontrollgruppe und  $4,39 \pm 0,13$  ml/Tag in der Vareniclingruppe festgestellt werden. Damit konnte keine signifikant verstärkte Aufnahme von Vareniclin zugesetztem Trinkwasser ermittelt werden ( $P > 0,05$ ; Student's t-Test).



**Abbildung 3.1:** Darstellung der täglich aufgenommenen Trinkwassermenge pro Maus C57BL/6-Mäuse wurden entweder der Kontrollgruppe oder der Vareniclingruppe (3 mg/kg/d) randomisiert zugeteilt. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der täglich aufgenommenen Trinkwassermenge zwischen den Versuchstiergruppen ermittelt werden ( $P > 0,05$ ; Student's t-Test). Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM aufgeführt ( $n=5$ ).

Nach Beendigung der oralen Vareniclinbehandlung über zwei Wochen wurden die C57BL/6-Mäuse für nachfolgende molekularbiologische Untersuchungen euthanasiert. In den entnommenen Organen erfolgte die Analyse der Genexpression mittels Western-Blot und Realtime-RT-PCR.

### 3.1.1.2. Effekt von Vareniclin auf die Regulation des $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptors

Bislang war bereits bekannt, dass Vareniclin, der Partialagonist am  $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptor, die nAChR-Bindung gegenüber unspezifischen, radioaktiv markierten Liganden *in vivo* erhöhte (Turner et al., 2011). Die folgenden Untersuchungen dienten der Beantwortung der Fragestellung, ob Vareniclin ebenfalls die Untereinheiten des  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR spezifisch regulierte. Verschiedene Applikationsformen und Dosierungen von Vareniclin wurden an C57BL/6-Mäusen getestet, um anschließend die Expression der  $\alpha_4$ - und  $\beta_2$ -Untereinheiten auf Protein- und mRNA-Ebene zu bestimmen.

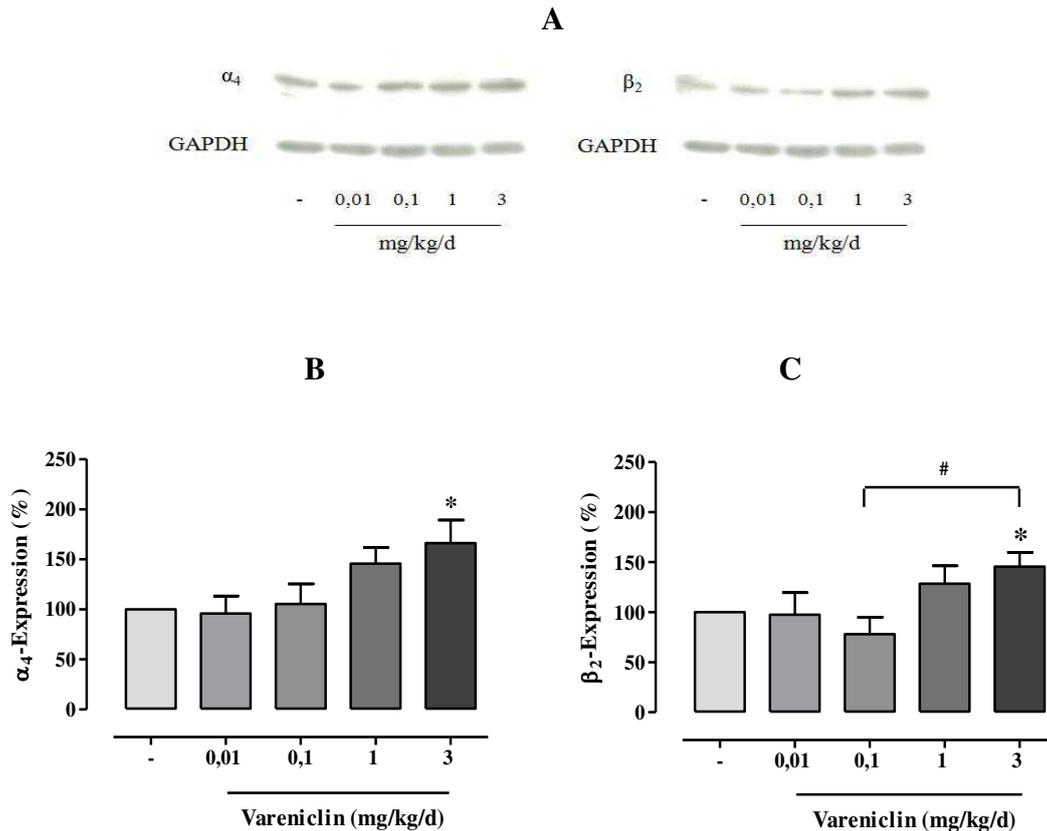
### **3.1.1.2.1. Effekt einer oralen Vareniclin-Behandlung**

In der folgenden Untersuchung wurde der Effekt einer oralen Vareniclinbehandlung auf die Expression der Untereinheiten des  $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptors untersucht. Die Aufnahme von Vareniclin über das Trinkwasser wurde über die Berechnung der täglichen individuellen Trinkwassermenge pro Maus gewährleistet (s. **Abbildung 3.1**). Die folgenden Untersuchungen dienten der Evaluierung eines potenziell dosisabhängigen Effekts von oral verabreichtem Vareniclin auf die Proteinexpression (s. **3.1.1.2.1.1.**) und mRNA-Transkription (s. **3.1.1.2.1.2.**) der  $\alpha_4$ - bzw.  $\beta_2$ -Untereinheit des nAChR. Die Bestimmung der Proteinexpression erfolgte in Lysaten aus dem Neocortex, dem Hippocampus und der Aorta. Die Messung der mRNA-Expression wurde an Gehirngewebe (Neocortex, Hippocampus) durchgeführt.

#### **3.1.1.2.1.1. Effekt von Vareniclin auf die Proteinexpression des $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptors**

Der Neocortex sowie die Hippocampi von C57BL/6-Mäusen wurden nach zweiwöchiger Verabreichung von Vareniclin über das Trinkwasser und Euthanasierung des Versuchstieres gewonnen. Dazu wurde wie in den Kapiteln **2.2.1.** und **2.2.5.** beschrieben, verfahren. Im Anschluss erfolgte die Evaluation der Proteinexpression mittels der Western-Blot-Methode (s. **2.4.4.**).

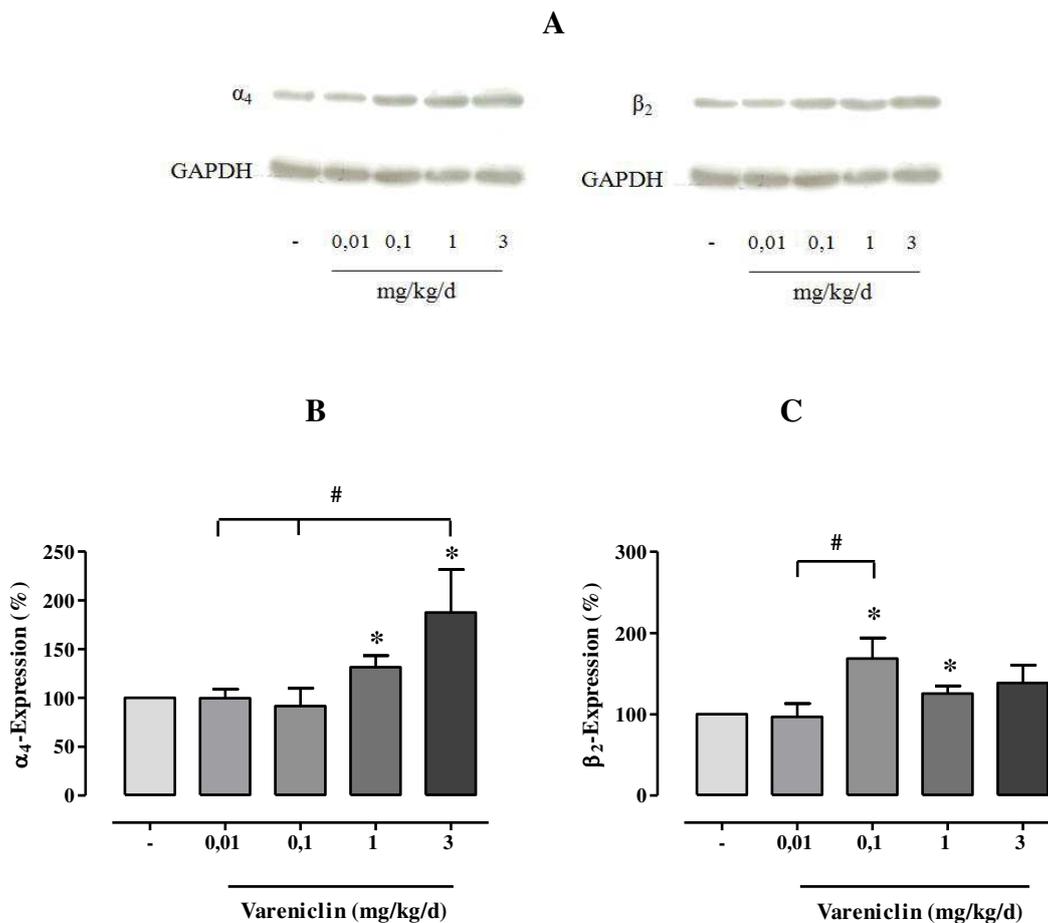
**Abbildung 3.2** charakterisiert die Regulation spezifischer Untereinheiten des nAChR im Neocortex. Die statistische Auswertung der Daten aus dem Neocortex ergab einen P-Wert von 0,029 und 0,036 für die  $\alpha_4$ - und  $\beta_2$ -Untereinheiten (One-way ANOVA). Für den statistischen Vergleich zwischen der 0,1 mg und 3 mg Dosis konnte ein signifikanter Unterschied in der Expression der  $\beta_2$ -Untereinheit ermittelt werden (Post-Test: Newman-Keuls). Die Auswertung der Daten der höchstgewählten Dosierung von Vareniclin im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren (100%) ermittelte eine signifikante Hochregulation der  $\alpha_4$ - und  $\beta_2$ -Untereinheit ( $P < 0,05$ ; Student's t-Test).



**Abbildung 3.2:** Quantitative Evaluierung der  $\alpha_4\beta_2$ -Expression im Neocortex

**A** Repräsentative Western-Blots zur Bestimmung der  $\alpha_4\beta_2$ -Expression in Cortexproben von C57BL/6-Mäusen nach Vehikel- (-) und Vareniclinintervention (Vareniclin 0,01; 0,1; 1; 3 mg/kg/d). **B, C** Eine signifikante Hochregulation beider Untereinheiten konnte durch die höchste Vareniclin-Dosis (3 mg/kg/d) ermittelt werden. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt (n=5-6). (Kontrolle=100%; die 100% Säule ist repräsentativ für alle Kontrollen). \*signifikanter Unterschied zu Vehikel ( $P < 0,05$ ), #signifikanter Unterschied ( $P < 0,05$ ).

**Abbildung 3.3** illustriert die Veränderung der Rezeptordichte im Hippocampus infolge der Behandlung mit Vareniclin. Diese Daten veranschaulichen eine Vareniclin-induzierte Hochregulation der  $\alpha_4$ - und  $\beta_2$ -Untereinheit ( $P=0,025$ ,  $P=0,028$ ; One-way ANOVA). Signifikante Unterschiede in der  $\alpha_4$ -Untereinheit konnten zwischen der 3 mg Dosis und niedriger gewählten Vareniclin-Dosen (0,01; 0,1 mg/kg/d) und der Vehikelgruppe ermittelt werden (Post-Test: Newman-Keuls). Die Anwendung des statistischen Tests für die  $\beta_2$ -Untereinheit brachte einen signifikanten Unterschied zwischen der 0,1 mg/kg Dosis und der zehnfach niedrigeren Dosis und keiner verabreichten Dosis zu Tage. Vareniclin induzierte Effekte auf die Regulation beider Untereinheiten bei einer Tagesdosis von 1 mg/kg im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren (100%) ( $P < 0,05$ ; Student's t-Test).



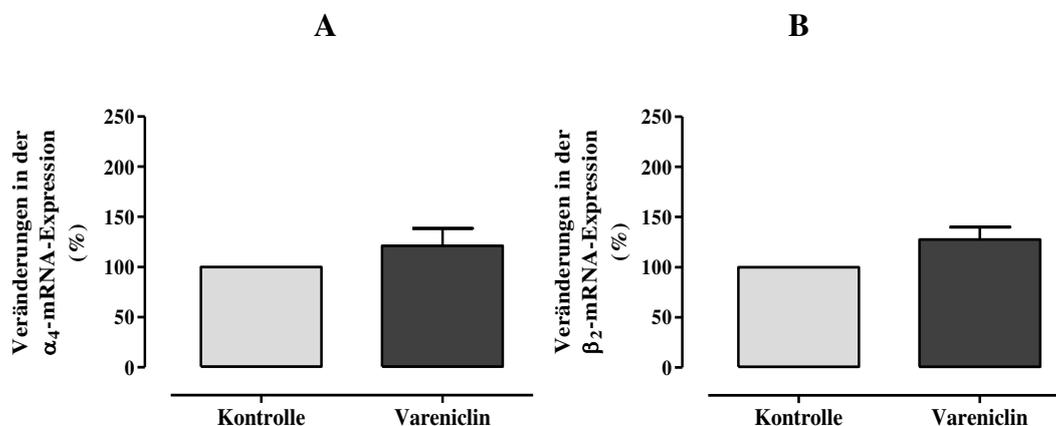
**Abbildung 3.3:** Quantitative Evaluierung der  $\alpha_4\beta_2$ -Expression im Hippocampus

**A** Repräsentative Western-Blots zur Bestimmung der  $\alpha_4\beta_2$ -Expression in Hippocampipproben von C57BL/6-Mäusen nach Vehikel- (-) und Vareniclinintervention (Vareniclin 0,01; 0,1; 1; 3 mg/kg/d). Eine signifikante Hochregulation beider Untereinheiten (**B**, **C**) konnte dosisabhängig ermittelt werden. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt (n=4-6). (Kontrolle=100%; die 100% Säule ist repräsentativ für alle Kontrollen).\*signifikanter Unterschied zu Vehikel (P<0,05), #signifikanter Unterschied (P<0,05)

In unserem Labor durchgeführte Vorversuche an Endothelzellen und glatten Muskelzellen zeigten eine Expression der Untereinheiten des nAChR im Gefäßsystem. Zur Aufklärung der Frage, ob die im Gehirn (Neocortex, Hippocampus) gemessenen Vareniclin-induzierten Effekte auf den  $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptor (s. **Abbildung 3.2**, **Abbildung 3.3**) das Resultat einer neuronalen oder vaskulären Regulation darstellten, diente die Aorta als Modell. Die Expression des nAChR wurde in der Aorta nach oraler Vareniclinbehandlung über 14 Tage untersucht. Dafür wurden C57BL/6-Tiere euthanasiert und die Aorta unter Freilegung aus dem umliegenden Thorax isoliert (s. **2.2.5**). **Abbildung 3.4** illustriert die in der Aorta



gewonnenen mRNA-Daten. Veränderungen in der mRNA-Expression sind für beide Untereinheiten des nAChR dargestellt.

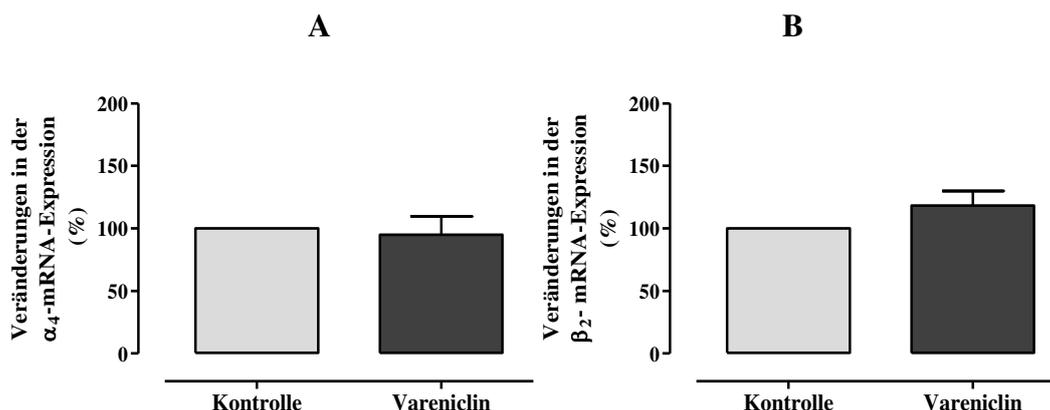


**Abbildung 3.5:** Realtime-RT-PCR-Messung.

Die Bestimmung der mRNA-Expression von  $\alpha_4$ - und  $\beta_2$ -Untereinheiten erfolgte im Neocortex nach oraler Vareniclingabe über zwei Wochen. Vareniclin wurde in einer mittleren Tagesdosis von 3 mg/kg eingesetzt. Es konnte weder für die  $\alpha_4$ - (A) noch für die  $\beta_2$ -Untereinheit (B) eine signifikant gesteigerte mRNA-Expression ermittelt werden ( $P > 0,05$ , Student's t-Test). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=5$ ). (Kontrolle=100%; die 100% Säule ist repräsentativ für alle Kontrollen).

Die statistische Auswertung veranschaulicht keinen signifikanten Unterschied in der mRNA-Expression beider Untereinheiten zwischen den Vareniclin- und unbehandelten C57BL/6-Mäusen im Cortex ( $P > 0,05$ ; Student's t-Test) (s. **Abbildung 3.5**). Auf Basis dieses Studienbefundes kann behauptet werden, dass die Verabreichung von Vareniclin via Trinkwasser keine Veränderung auf Transkriptionsebene des  $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptors bewirkte. Diese Daten sind in Kontrast zu den vorangestellten Ergebnissen der Proteinexpression im Neocortex (s. **Abbildung 3.2**).

**Abbildung 3.6** illustriert die graphische Auswertung der durchgeführten RT-PCR-Versuche im Hippocampus nach oraler Vareniclinbehandlung (3 mg/kg/d) und unter Kontrollbedingungen. Es konnte weder für die  $\alpha_4$ - noch für die  $\beta_2$ -Untereinheit ein statistisch signifikantes Ergebnis erzielt werden ( $P > 0,05$ ; Student's t-Test). Diese Daten lassen vermuten, dass die Applikation von Vareniclin keine Veränderungen in der mRNA-Expression der Untereinheiten des nAChR im Hippocampus induzierte.



**Abbildung 3.6:** Realtime-RT-PCR-Messung

Die Bestimmung der mRNA-Expression von  $\alpha_4$ - und  $\beta_2$ -Untereinheiten erfolgte in gepoolten Hippocampiprüben nach oraler Vareniclingabe über 2 Wochen. Vareniclin wurde in einer mittleren Tagesdosis von 3 mg/kg eingesetzt. Es konnte weder für die  $\alpha_4$ - (A) noch für die  $\beta_2$ -Untereinheit (B) eine signifikant gesteigerte mRNA-Expression gezeigt werden ( $P > 0,05$ ; Student's t-Test). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=5$ ). (Kontrolle=100%; die 100% Säule ist repräsentativ für alle Kontrollen).

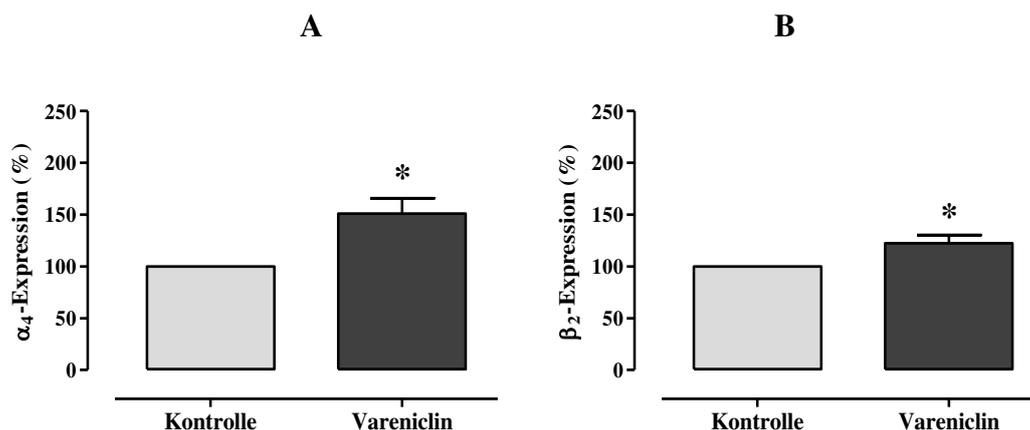
### 3.1.1.2.2. Effekt einer Vareniclin-Injektion

In der nachfolgenden Studie wurde die Fragestellung geklärt, ob die Injektion mit Vareniclin (3 mg/kg) eine signifikante Veränderung in der neuronalen Rezeptorexpression induzierte. Dafür wurde Vareniclin über einen Zeitrahmen von zwei Wochen einmal täglich intraperitoneal (i.p.) verabreicht (s. 2.2.2.). Nach Euthanasie der Versuchstiere erfolgte die Evaluierung der Protein- und mRNA-Expression beider Untereinheiten des  $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptors.

#### 3.1.1.2.2.1. Effekt von Vareniclin auf die Proteinexpression des $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptors

Die folgenden Untersuchungen dienen der Unterstützung der aus dem oralen Protokoll gewonnenen Daten (s. 3.1.1.2.1.1.). Diese Daten wurden von dem Masterstudenten Torben Peter (Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) erhoben und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

**Abbildung 3.7** veranschaulicht die Regulation beider Untereinheiten durch Vareniclin (3 mg/kg, i.p.) im Cortexgewebe.



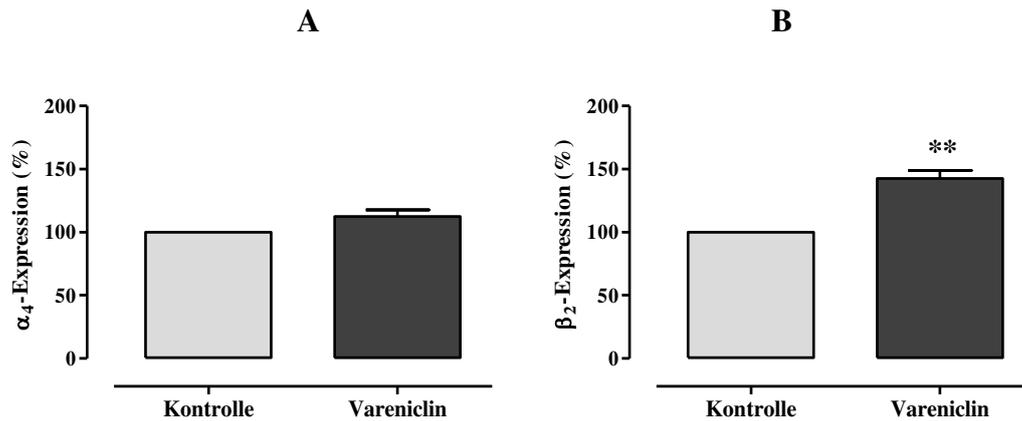
**Abbildung 3.7:** Quantitative Evaluierung der  $\alpha_4\beta_2$ -Expression im Neocortex von C57BL/6-Mäusen nach Vehikel- und Vareniclinintervention

Eine signifikante Hochregulation konnte für beide Untereinheiten (**A**, **B**) ermittelt werden. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt (n=7). (Kontrolle=100%; die 100% Säule ist repräsentativ für alle Kontrollen). \*signifikanter Unterschied zu Vehikel (P<0,05; Student's t-Test)

Die statistische Auswertung ermittelte signifikante Unterschiede in den Expressionsmustern beider Untereinheiten des nAChR bei Vergleich der beiden Studiengruppen (P<0,05; Student's t-Test). Die hier beobachtete Hochregulation infolge i.p. Vareniclin steht in Einklang mit den aus dem oralen Protokoll eruierten Daten (s. **3.1.1.2.1.1**).

Die Bestimmung der Proteinexpression der Untereinheiten des nAChR wurde ebenfalls im Hippocampus durchgeführt. Inwiefern Vareniclin eine veränderte Expression des hippocampalen  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR induzierte, ist in **Abbildung 3.8** illustriert.

Die Analyse der Western-Blot-Experimente ermittelte eine signifikante Hochregulation der  $\beta_2$ -Untereinheit des  $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptors durch Vareniclin (P<0,01; Student's t-Test). Hingegen wurde für die  $\alpha_4$ -Untereinheit ein P-Wert von 0,055 ermittelt (Student's t-Test). Diese Daten suggerieren eine spezifische Beeinflussung der Untereinheiten des  $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptors durch den Partialagonisten.



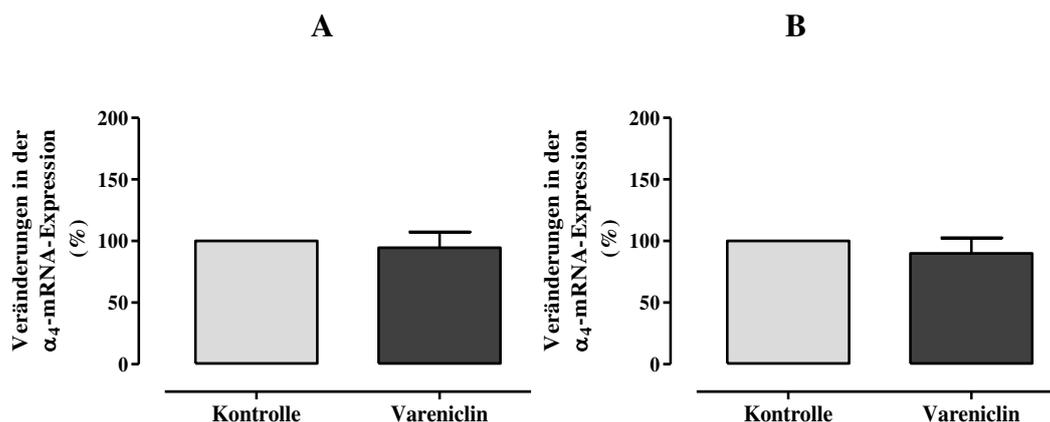
**Abbildung 3.8:** Quantitative Evaluierung der  $\alpha_4\beta_2$ -Expression im Hippocampus von C57BL/6-Mäusen nach Vehikel- und Vareniclininjektion (3 mg/kg/d, i.p.)

Eine signifikante Hochregulation konnte für die  $\beta_2$ -Untereinheit ermittelt werden (**B**). Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt (n=7). (Kontrolle=100%; die 100% Säule ist repräsentativ für alle Kontrollen). \*\*signifikanter Unterschied zu Vehikel (P<0,01; Student's t-Test)

### 3.1.1.2.2. Effekt von Vareniclin auf die mRNA-Expression des $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptors

Die folgenden Untersuchungen dienten der Bestätigung der Vareniclin-induzierten Hochregulation des  $\alpha_4\beta_2$ -Proteins. Die Durchführung von RT-PCR-Experimenten ermöglichte die Erfassung von Änderungen in der mRNA-Expression beider Untereinheiten des nAChR. **Abbildung 3.9** veranschaulicht die graphische Auswertung der unter Kontrollbedingungen und nach Vareniclininjektion gemessenen mRNA-Expression im Neocortex.

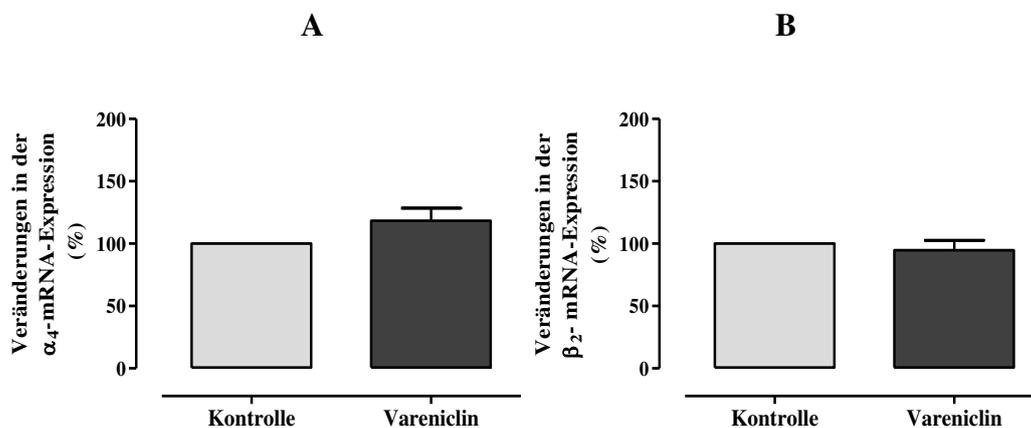
Es konnte keine signifikante Veränderung in der mRNA-Expression nach Vareniclininjektion ermittelt werden (P>0,05, Student's t-Test). Dies gilt für beide Untereinheiten des  $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptors. Diese mRNA-Daten bestätigten nicht die Vareniclin-induzierte Hochregulation des  $\alpha_4\beta_2$ -Proteins. Jedoch ist dieser Befund im Einklang mit der unveränderten mRNA-Expression nach oraler Gabe von Vareniclin (s. **Abbildung 3.5**).



**Abbildung 3.9:** Realtime-RT-PCR-Messung

Die Bestimmung der mRNA-Expression von  $\alpha_4$ - und  $\beta_2$ -Untereinheiten erfolgte im Neocortex nach täglicher i.p. Injektion von Vareniclin über 2 Wochen. Vareniclin wurde in einer mittleren Tagesdosis von 3 mg/kg eingesetzt. Es konnte weder für die  $\alpha_4$ - (A) noch für die  $\beta_2$ -Untereinheit (B) eine signifikant gesteigerte mRNA-Expression gezeigt werden ( $P > 0,05$ ; Student's t-Test). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=5$ ). (Kontrolle=100%; die 100% Säule ist repräsentativ für alle Kontrollen).

**Abbildung 3.10.** illustriert die graphische Auswertung der RT-PCR-Experimente, welche in gepoolten Hippocampiprüben infolge der Vareniclinbehandlung und unter Kontrollbedingungen durchgeführt wurden.



**Abbildung 3.10:** Realtime-RT-PCR-Messung

Die Bestimmung der mRNA-Expression von  $\alpha_4$ - und  $\beta_2$ -Untereinheiten erfolgte in gepoolten Hippocampiprüben nach i.p. Injektion von Vareniclin über 2 Wochen. Vareniclin wurde in einer mittleren Tagesdosis von 3 mg/kg eingesetzt. Es konnte weder für die  $\alpha_4$ - (A) noch für die  $\beta_2$ -Untereinheit (B) eine signifikant gesteigerte mRNA-Expression gezeigt werden ( $P > 0,05$ ). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=5$ ). (Kontrolle=100%; die 100% Säule ist repräsentativ für alle Kontrollen).

Die veranschaulichte mRNA-Expression nach Vareniclininjektion ist bei beiden Untereinheiten des  $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptors unverändert im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren ( $P > 0,05$ ; Student's t-Test). Dieser Befund bestätigt die vorausgegangenen Ergebnisse einer unbeeinflussten Regulation der mRNA-Expression des  $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptors im Hippocampus infolge Vareniclinapplikation (s. **Abbildung 3.6**).

#### **3.1.2. Untersuchungen zum Effekt von Vareniclin *in vitro***

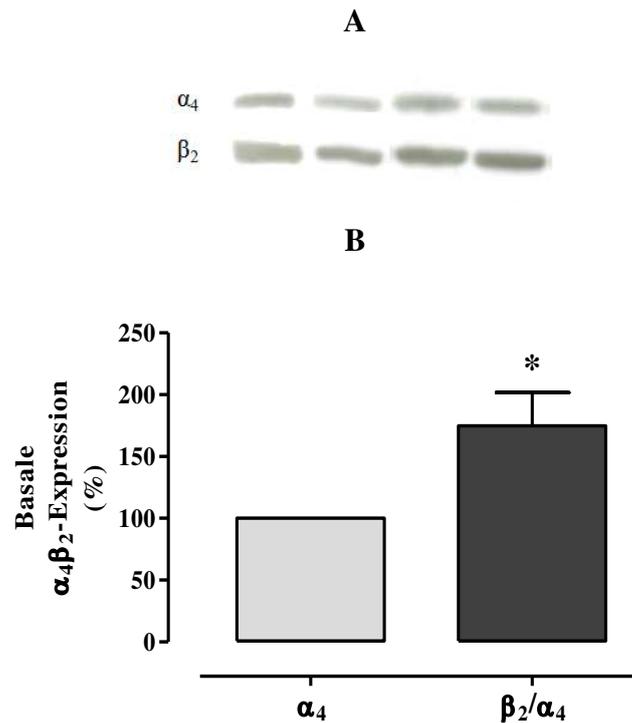
Zur Aufklärung der Frage, ob Vareniclin in Zellen eine Veränderung der Untereinheiten des  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR verursacht, wurden Inkubationsversuche an Kulturen neuronaler und endothelialer Zelllinien (HT-22, bEnd.3) durchgeführt. Western-Blot-Analysen und RT-PCR-Experimente dienten der Erfassung einer veränderten Regulation auf Protein- oder mRNA-Basis infolge der Stimulation mit Vareniclin.

##### **3.1.2.1. Auswahl einer geeigneten neuronalen Zelllinie**

###### **3.1.2.1.1. Basale Expression der Untereinheiten**

Bei der getesteten Zelllinie HT-22 handelt es sich um neuronale Zellen, welche ursprünglich aus murinen Hippocampuszellen gewonnen und kultiviert wurden. Aus in unserem Labor durchgeführten Vorversuchen an HT-22 Zellen war bereits bekannt, dass Zellen der Passagen 13-15 den  $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptor exprimierten. **Abbildung 3.11** illustriert die basale Proteinexpression der  $\alpha_4$ - und  $\beta_2$ -Untereinheiten in HT-22 Zellen.

Der Vergleich des basalen Expressionsniveaus beider Untereinheiten verdeutlicht einen signifikanten Unterschied zwischen der  $\alpha_4$ - und der  $\beta_2$ -Untereinheit ( $P < 0,05$ ; Student's t-Test). Dabei konnte die erhöhte Expression der  $\beta_2$ -Untereinheit mit dem Faktor 180% angegeben werden (s. **Abbildung 3.11**).



**Abbildung 3.11:** Quantitative Evaluierung der in Extrakten von HT-22 Zellen enthaltenen Untereinheiten des nAChR

**A** Repräsentative Western-Blot-Signale der  $\alpha_4$ - und  $\beta_2$ -Untereinheiten. **B** Aufgetragen ist die basale  $\alpha_4\beta_2$ -Expression. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt (n=5). ( $\alpha_4$ =100%; die 100% Säule ist repräsentativ). \*signifikanter Unterschied zu  $\alpha_4$  (P<0,05; Student's t-Test)

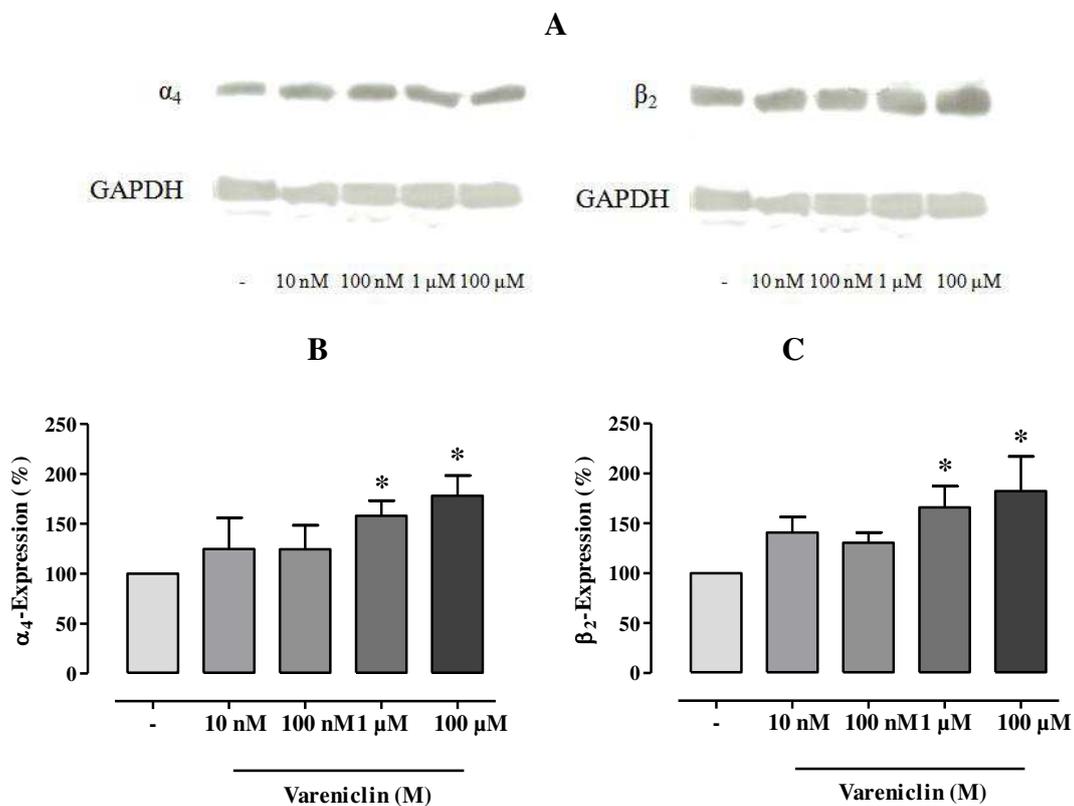
### 3.1.2.1.2. Stimulation mit Vareniclin für unterschiedliche Zeitintervalle

Zur Untersuchung einer möglichen Regulation durch Vareniclin am Subtyp  $\alpha_4\beta_2$  von nikotinergen Rezeptoren wurden HT-22 Zellen mit Vareniclin (Endkonzentration 1  $\mu$ M) inkubiert. Aufgrund der bekannten langsamen Kinetik des nAChR wurden ausreichend lange Inkubationszeiten (24 h, 48 h) ausgewählt. **Abbildung 3.12** illustriert die ermittelten Ergebnisse der  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR-Expression, welche nach verschieden lang andauernden Vareniclininkubationen gewonnen wurden.



### 3.1.2.2. Effekt von Vareniclin auf die Proteinexpression des neuronalen $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptors

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit bestand in der Untersuchung dosisabhängiger Effekte von Vareniclin auf den  $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptor. Dessen Regulation wurde nach 48stündiger Inkubation von HT-22 Zellen mit Vareniclin mittels Western-Blot eruiert. Diese Inkubationsdauer (48 h) wurde ausgewählt, weil sie eine robuste Hochregulation nach Vareniclininkubation versprach (s. **Abbildung 3.12**). Zur Untersuchung einer dosisabhängigen Regulation wurden vier verschiedene Konzentrationen von Vareniclin (10 nM, 100 nM, 1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M) eingesetzt und nachfolgend die spezifische Expression der  $\alpha_4$ - und  $\beta_2$ -Untereinheit bestimmt.



**Abbildung 3.13:** Quantitative Evaluierung der  $\alpha_4\beta_2$ -Expression in HT-22 Zellen

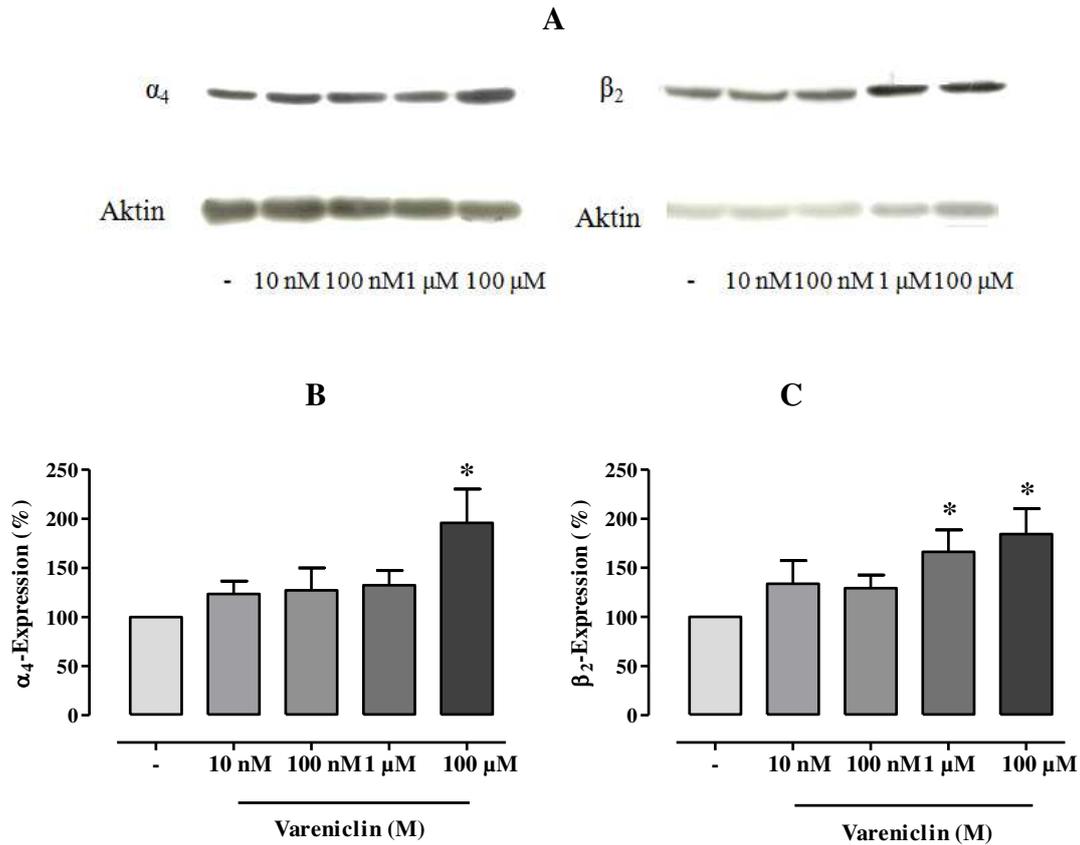
**A** Repräsentative Western-Blots zur Bestimmung der  $\alpha_4\beta_2$ -Expression in Extrakten von Vehikel(-) und Vareniclin-inkubierten HT-22 Zellen (Vareniclin 10 nM, 100 nM, 1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M). Die in **B** und **C** dargestellten Ergebnisse verdeutlichen eine dosisabhängige Hochregulation sowohl der  $\alpha_4$ - (**B**) als auch der  $\beta_2$ -Untereinheit (**C**) nach 48 h Inkubation mit Vareniclin im Vergleich zu Vehikel. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt (alle Gruppen n=5-8). (Kontrolle=100%; die 100% Säule ist repräsentativ für alle Kontrollen). \*signifikanter Unterschied zu Vehikel (P<0,05)

Die quantitative Evaluierung der Western-Blots veranschaulicht eine dosisabhängige Hochregulation sowohl der  $\alpha_4$ - als auch der  $\beta_2$ -Untereinheit nach einer 48 h Inkubation mit Vareniclin ( $P=0,044$ ;  $P=0,047$ ; One-way ANOVA). Dabei konnte für beide Untereinheiten des  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR eine signifikant erhöhte Expression infolge der Stimulation mit Vareniclin ( $1 \mu\text{M}$ ,  $100 \mu\text{M}$ ) ermittelt werden (Post-Test: Newman-Keuls).

#### **3.1.2.2.1. Effekt von Vareniclin in der Membran**

Für den  $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptor war bekannt, dass seine Untereinheiten sowohl membrangebunden als auch internalisiert im Zytosol vorliegen. Zur Klärung der Frage, ob die beobachtete Hochregulation (s. **Abbildung 3.13**) durch die Beeinflussung membranständiger Rezeptoren herrührt oder als Folge einer vermehrten Bildung von Untereinheiten im Zytosol auftritt, wurden isolierte Membranpräparationen aus Vehikel- und Vareniclin-inkubierten HT-22 Zellen hergestellt (s. **2.4.2.2.**). Die für die membranäre Fraktion gemessene Veränderung der Rezeptordichte nach Vareniclininkubation über 48 h ist in folgender Abbildung (s. **Abbildung 3.14**) dargestellt.

Die statistische Auswertung mittels One-way ANOVA ermittelte für beide Untereinheiten einen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen ( $P=0,028$ ;  $P=0,021$ ). Signifikant regulatorische Effekte auf die  $\alpha_4$ - und  $\beta_2$ -Untereinheit induzierte die höchstgewählte Vareniclindosis ( $100 \mu\text{M}$ ). Vareniclin in einer Endkonzentration von  $1 \mu\text{M}$  führte zu einer signifikant verstärkten Expression der  $\beta_2$ -Untereinheit nach 48 h (Post-Test: Newman-Keuls) (s. **Abbildung 3.14**).



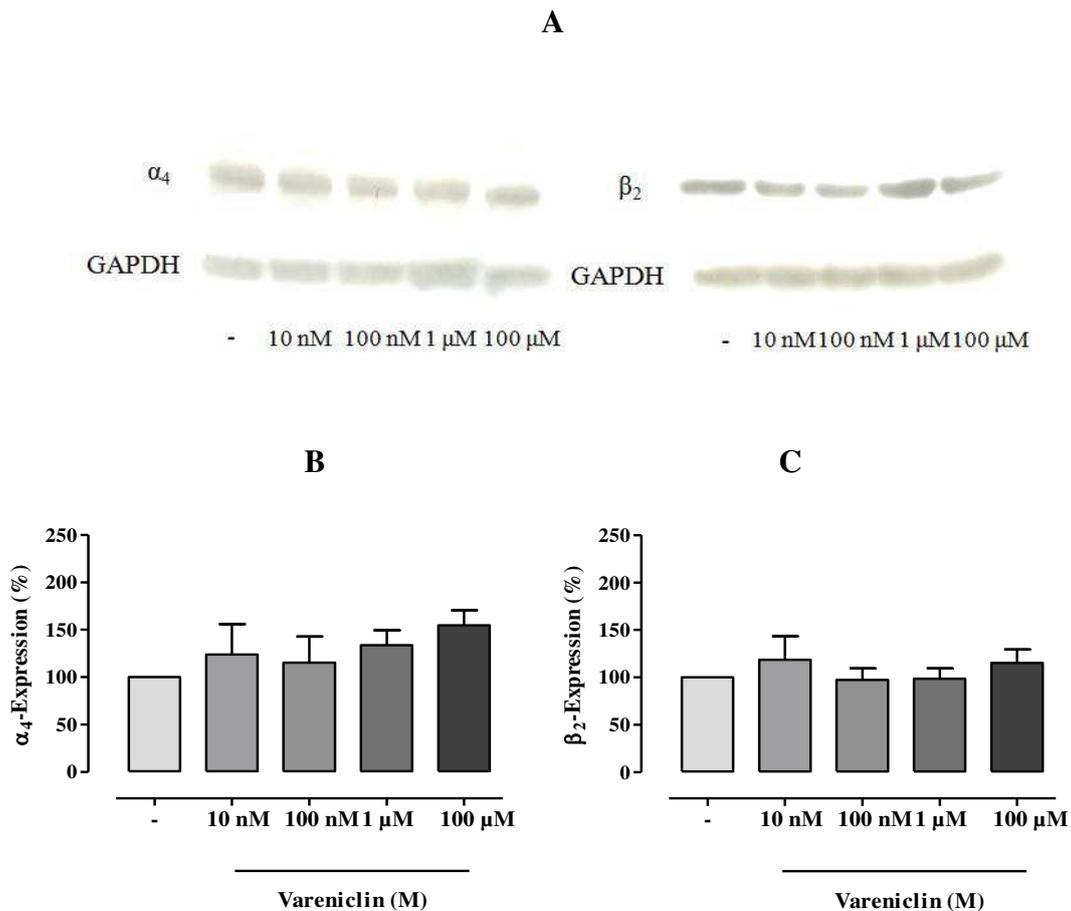
**Abbildung 3.14:** Quantitative Evaluierung der  $\alpha_4\beta_2$ -Expression in HT-22 Zellen

**A** Repräsentative Western-Blots zur Bestimmung der  $\alpha_4\beta_2$ -Expression in Membranpräparationen von Vehikel(-) und Vareniclin-inkubierten HT-22 Zellen (Vareniclin 10 nM, 100 nM, 1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M). Die in **B** und **C** dargestellten Ergebnisse verdeutlichen eine dosisabhängige Hochregulation sowohl der  $\alpha_4$ - (**B**) als auch der  $\beta_2$ -Untereinheit (**C**) nach 48 h Inkubation mit Vareniclin im Vergleich zu Vehikel (Kontrolle=100%; die 100% Säule ist repräsentativ für alle Kontrollen). Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt (n=6-12). \*signifikanter Unterschied zu Vehikel (P<0,05)

Für die Zelllysate und die membranären Fraktionen konnten quantitativ ähnliche Faktoren in der densitometrischen Auswertung berechnet werden (s. **Abbildung 3.13**, **Abbildung 3.14**). Dies spricht für eine Hochregulation, die ihren Ursprung in einer Veränderung der Rezeptordichte in der Membran findet.

### 3.1.2.2.2. Effekt von Vareniclin im Zytosol

Die Gesamtheit der zytosolischen Fraktion beinhaltet kleine nAChR-Fragmente, die in Vesikeln im Zytosol vorliegen oder an Golgi-Apparat und Endoplasmatischem Retikulum assoziieren. Die folgende Abbildung (s. **Abbildung 3.15**) fasst die quantitative Evaluierung der Proteinexpression von  $\alpha_4$ - und  $\beta_2$ -Untereinheiten zusammen, die aus zytosolischen Fraktionen nach Vehikel- und Vareniclinstimulation gewonnen wurden.



**Abbildung 3.15:** Quantitative Evaluierung der  $\alpha_4\beta_2$ -Expression in HT-22 Zellen

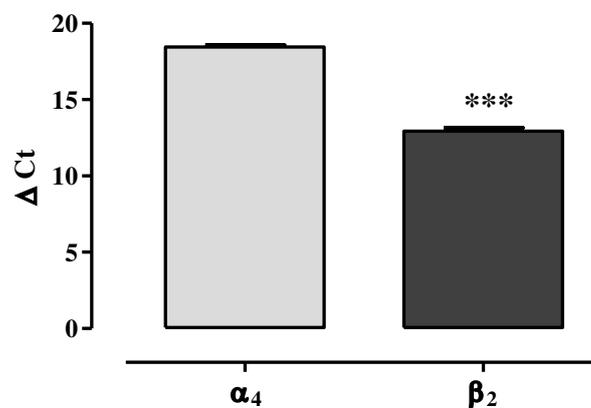
**A** Repräsentativer Western-Blot zur Bestimmung der  $\alpha_4\beta_2$ -Expression in zytosolischen Fraktionen von Vehikel(-) und Vareniclin-inkubierten HT-22 Zellen (Vareniclin 10 nM, 100 nM, 1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M). Eine signifikante Hochregulation der Untereinheiten konnte für keine der eingesetzten Vareniclinkonzentrationen ermittelt werden (**B, C**). Inkubationszeitdauer: 48 h. (Kontrolle=100%; die 100% Säule ist repräsentativ für alle Kontrollen). Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt (n=4-6).

Die statistische Auswertung mittels One-way ANOVA ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, weder für die  $\alpha_4$ - noch für die  $\beta_2$ -Untereinheit ( $P > 0,05$ ; One-way ANOVA). Auf Basis dieses Studienbefundes muss vermutet werden, dass Vareniclin keine signifikant veränderte Expression zytosolischer Untereinheiten des nAChR bewirkte.

### 3.1.2.3. mRNA-Expression des neuronalen $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptors *in vitro*

#### 3.1.2.3.1. Basale Expression der Untereinheiten

Realtime-Experimente dienten der Erfassung der  $\alpha_4\beta_2$ -mRNA-Expression in HT-22 Zellen. Zur Bestimmung der basalen mRNA-Expression beider Untereinheiten des nAChR wurde der  $\Delta\text{Ct}$ -Wert herangezogen, der umso schneller erreicht wird, je mehr basale RNA vorhanden ist (s. 2.5.5.). **Abbildung 3.16** charakterisiert die basale mRNA-Expression der  $\alpha_4$ - und der  $\beta_2$ -Untereinheiten in HT-22 Zellen.

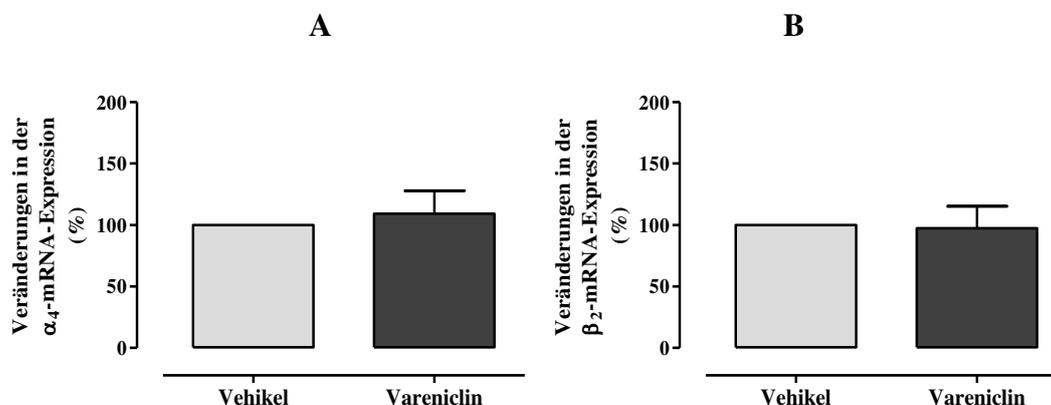


**Abbildung 3.16:** Quantitative Evaluierung der basalen mRNA-Expression von  $\alpha_4$ - und  $\beta_2$ -Untereinheiten. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM des  $\Delta\text{Ct}$ -Werts von  $\alpha_4$ - und  $\beta_2$ -Untereinheit ( $n=5$ ). \*\*\*signifikanter Unterschied zwischen  $\alpha_4$ - und  $\beta_2$ -Untereinheit ( $P < 0,001$ ; Student's t-Test)

Die dargestellten Ergebnisse veranschaulichen eine signifikant höhere Expression der  $\beta_2$ -mRNA im Vergleich zur  $\alpha_4$ -mRNA ( $P < 0,001$ ; Student's t-Test), dargestellt über den  $\Delta\text{Ct}$ -Wert.

### 3.1.2.3.2. Effekt von Vareniclin auf die mRNA-Expression des $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptors

RT-PCR-Experimente dienen der Evaluierung, ob die gesteigerte Proteinexpression des  $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptors in HT-22 Zellen mit einer gesteigerten mRNA-Expression einherging. Veränderungen in der mRNA-Expression sprechen für eine gesteigerte *de novo* Proteinbiosynthese des untersuchten Proteins. Es wurde die Vareniclinkonzentration (1  $\mu\text{M}$ ) ausgewählt, die in den vorangegangenen Western-Blot Experimenten (s. **3.1.2.2.**) eine robuste Hochregulation beider Untereinheiten induzierte (s. **Abbildung 3.13**). Der Effekt von Vareniclin auf die  $\alpha_4$ - und  $\beta_2$ -mRNA-Expression nach einer Inkubationsdauer von 48 h ist in **Abbildung 3.17** dargestellt.



**Abbildung 3.17:** Realltime-RT-PCR-Messung

Die Bestimmung der mRNA-Expression von  $\alpha_4$ - und  $\beta_2$ -Untereinheiten erfolgte in HT-22 Zellen nach Vehikel- und Vareniclininkubation (48 h). Vareniclin wurde in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Es konnte weder für die  $\alpha_4$ - (A) noch für die  $\beta_2$ -Untereinheit (B) eine signifikant gesteigerte mRNA-Expression gezeigt werden ( $P > 0,05$ ; Student's t-Test). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=5$ ). (Kontrolle=100%; die 100% Säule ist repräsentativ für alle Kontrollen).

Die densitometrische Auswertung der Western-Blot Experimente brachte keine signifikante Unterschiede zu Tage. Es konnte weder für die  $\alpha_4$ - noch für die  $\beta_2$ -Untereinheit ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Vehikel- und Vareniclinintervention beobachtet werden ( $P > 0,05$ ; Student's t-Test).

### 3.1.2.4. Effekt von Vareniclin auf cerebrale Endothelzellen

Vorversuche demonstrierten eine Expression des  $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptors in Endothel- und glatten Muskelzellen. Aus diesem Grunde wurde die Fragestellung untersucht, ob die Vareniclin-induzierte Hochregulation ein für Neuronen spezifisches Phänomen darstellt oder ebenfalls in cerebralen Endothelzellen beobachtet werden kann. Zum Einsatz kamen *brain endothelium cells* (bEnd.3), die von der Universität Bonn zur Verfügung gestellt wurden. Getestet wurden die  $\alpha_4$ - und  $\beta_2$ -Untereinheiten des nAChR sowohl auf Protein- als auf mRNA-Ebene.

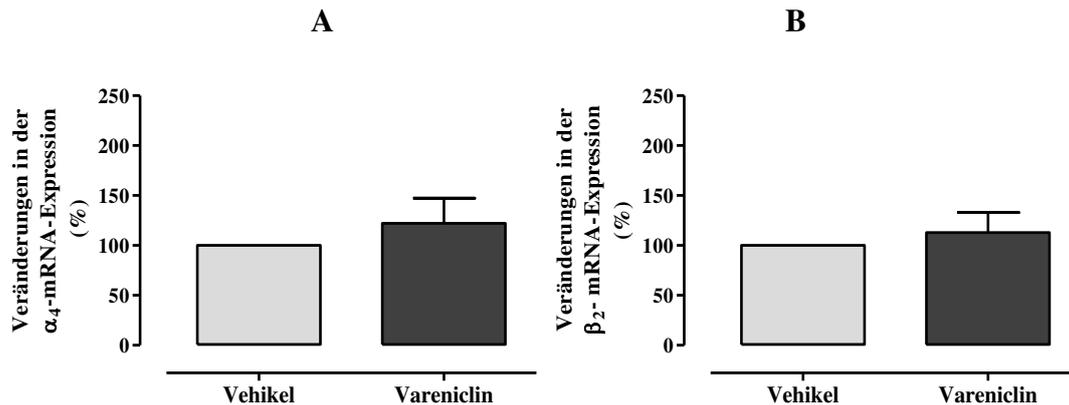
#### 3.1.2.4.1. Effekt von Vareniclin auf die Proteinexpression des $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptors

bEnd.3 Zellen wurden für 48 Stunden mit Vareniclin inkubiert. Zur Untersuchung einer dosisabhängigen Regulation wurden verschiedene Konzentrationen von Vareniclin (10 nM, 100 nM, 1  $\mu$ M) eingesetzt und nachfolgend die spezifische nAChR-Expression via Western-Blot-Methode bestimmt. **Abbildung 3.18.** illustriert die Regulation der Untereinheiten des  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR in bEnd.3 Zellen.

Die quantitative Evaluierung der Western-Blots veranschaulicht eine dosisabhängige Hochregulation sowohl der  $\alpha_4$ - als auch der  $\beta_2$ -Untereinheit nach 48 h Inkubation mit Vareniclin (1  $\mu$ M) ( $P < 0,05$ ; One-way ANOVA, Post-Test: Newman-Keuls). Dabei konnte für die  $\alpha_4$ -Untereinheit ein signifikanter Unterschied zwischen den Konzentrationen 10 nM und 1  $\mu$ M beobachtet werden.

Die bEnd.3 Zellen verhalten sich hinsichtlich ihrer Ansprechbarkeit auf eine Regulierung des nAChR in ähnlicher Weise wie die HT-22 Zellen.





**Abbildung 3.19:** Realtime-RT-PCR-Messung

Die Bestimmung der mRNA-Expression von  $\alpha_4$ - und  $\beta_2$ -Untereinheiten erfolgte in bEnd.3 Zellen nach Vehikel- und Vareniclininkubation. Vareniclin wurde in einer Konzentration von 1  $\mu$ M eingesetzt. Es konnte weder für die  $\alpha_4$ - (A) noch für die  $\beta_2$ -Untereinheit (B) eine signifikant gesteigerte mRNA-Expression gezeigt werden ( $P > 0,05$ ). Inkubationsdauer: 48 h. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=5$ ). (Kontrolle=100%; die 100% Säule ist repräsentativ für alle Kontrollen).

Die graphische Auswertung (s. **Abbildung 3.19**) veranschaulichte keine signifikant veränderte Expression der  $\alpha_4$ -Untereinheit nach Vareniclin- oder Vehikelintervention. Auch für die  $\beta_2$ -Untereinheit wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Vehikel- und Vareniclin-inkubierten bEnd.3 Zellen gefunden ( $P > 0,05$ ; Student's t-Test). Auf Basis dieses Befundes muss davon ausgegangen werden, dass die gesteigerte Proteinexpression infolge Vareniclinstimulation ohne Beteiligung der Transkriptionsebene abläuft.

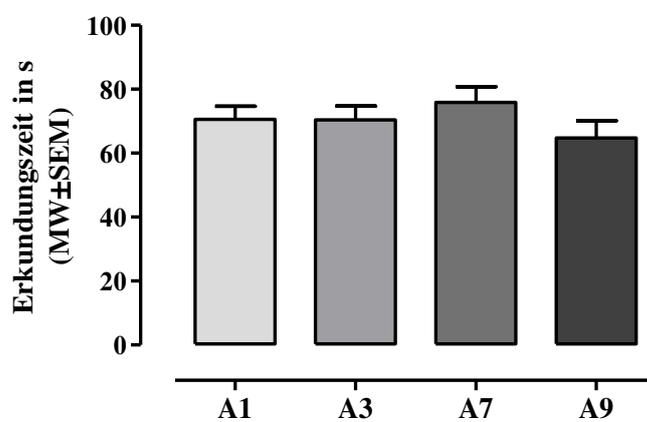
### 3.1.3. Untersuchungen zur kognitiven Funktion

#### 3.1.3.1. Etablierung eines Modells zur Testung kognitiver Funktionen

Die Objektwiedererkennung wurde 1988 von Ennaceur und Delacour erstmalig an Ratten durchgeführt (Ennaceur & Delacour, 1988). Sie basiert auf dem spontanen Verhalten von Nagetieren, unvertraute Objekte stärker zu explorieren als bekannte Objekte (Mumby et al., 2002; Dere et al., 2005). Diese Diskriminationsleistung über den physischen Kontakt des Nagetieres zum Objekt basiert auf der Bildung von Gedächtnisinhalten mit der Folge der Erkennung des vertrauten Objekts. Im Folgenden wurden Versuche zum Objektgedächtnis durchgeführt (s. **2.6**). Dafür wurden zunächst die Apparatur und die gewählten Objekte etabliert (s. **3.1.3.1.1**).

### 3.1.3.1.1. Testung der Apparatur und der Objekte

Zunächst wurde das Feld in allen Ecken des Offenfeldes optimal ausgeleuchtet (18 Lux) und die Aufenthaltszeit der Tiere in den verschiedenen Ecken bestimmt. So ließ sich eine Präferenz der Tiere für eine mögliche Position und damit für ein mögliches Objekt in dieser Position ausschließen (s. **Abbildung 3.20**). Die Positionen, in welchen in nachfolgenden Versuchen die Objekte randomisiert zugeteilt wurden, wurden mit A1, A3, A7, und A9 bezeichnet (für einen Vergleich der beschrifteten Positionen s. **Abbildung 2.4**).

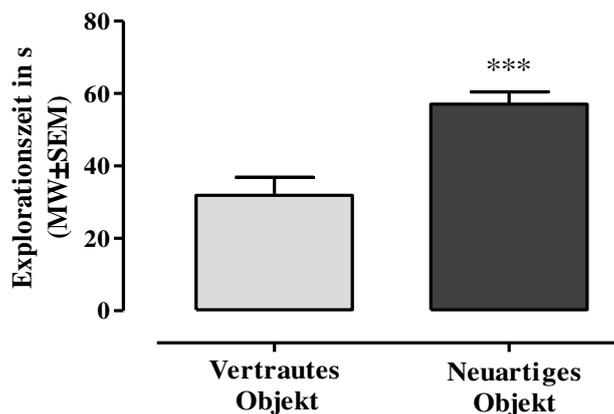


**Abbildung 3.20:** Aufenthaltszeiten der Versuchstiere in den Positionen A1 (obere linke Ecke), A3 (obere rechte Ecke), A7 (untere linke Ecke), A9 (untere rechte Ecke) (s. **Abbildung 2.4**). Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt (n=13). Es konnte kein signifikanter Unterschied in den Aufenthaltszeiten in den verschiedenen Positionen beobachtet werden ( $P > 0,05$ ).

Die statistische Auswertung der Aufenthaltszeiten verdeutlicht, dass für ein Versuchsset von 13 Tieren keine ortsbezogene Präferenz ermittelt werden konnte ( $P > 0,05$ ) (s. **Abbildung 3.20**). Zudem wurde die Explorationsneigung von C57BL/6-Mäusen gegenüber den in späteren Untersuchungen eingesetzten Objekten bestimmt. Dies diente dem Ausschluss falsch positiver Ergebnisse, die nicht auf einer Wiedererkennung des bekannten Objektes beruhen, sondern auf einer Neigung des Versuchstieres, eines der beiden Objekte in der Exploration zu präferieren. Für ein Versuchsset von 14 C57BL/6-Mäusen konnten nicht signifikant differente Explorationszeiten an den Objekten von  $31,16 \pm 3,02$  s und  $34,84 \pm 4,13$  s (MW  $\pm$  SEM) ermittelt werden ( $P > 0,05$ ; Student's t-Test). Die gemessenen Erkundungszeiten veranschaulichen keine *per se* Präferenz für eines der Objekte wie auch eine ausreichende Erkundungszeit am Objekt ( $\geq 10$ s, s. **2.6.2.**)

### 3.1.3.1.2. Testung der Objektwiedererkennung unter Kontrollbedingungen

Pilotexperimente dienten der Klärung der Fragestellung, ob die Versuchstiere unter den gewählten Bedingungen (Verzögerungsintervall, Objekte) zwischen zwei möglichen Objekten zugunsten des neuartigen diskriminieren können. Dafür wurden männliche C57BL/6-Tiere in der Objektwiedererkennung getestet. In einem ersten Versuchsdurchgang wurden zwei identische Objekte präsentiert. Nach Verstreichen eines 50minütigen Intervalls, in welchem die Versuchstiere in ihren Käfig verbracht wurden, folgte der Testdurchlauf. Dabei wurde eines der präsentierten Objekte durch ein unbekanntes ausgetauscht. Der Testdurchlauf diente der Erfassung der Diskriminationsleistung zwischen den Objekten. **Abbildung 3.21** veranschaulicht die graphische Auswertung der Explorationszeiten (MW  $\pm$  SEM) am vertrauten und neuartigen Objekt.



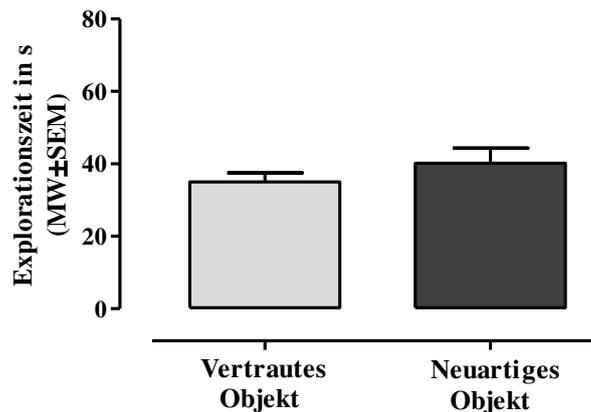
**Abbildung 3.21:** Graphische Darstellung der Explorationszeiten (s) im Testdurchgang. Eines der bekannten Objekte aus dem ersten Durchgang wurde im Testdurchgang durch ein neuartiges Objekt ausgetauscht. Es konnte ein hochsignifikanter Unterschied in den Erkundungszeiten zwischen den beiden Objekten festgestellt werden ( $P < 0,001$ ; Student's t-Test). Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt ( $n=10$ ). \*\*\*signifikanter Unterschied ( $P < 0,001$ )

Für das zuvor präsentierte Objekt wurde in der Testphase eine Explorationszeit von  $31,90 \pm 4,97$  s ermittelt. Die Erkundungszeit am neuartigen Objekt konnte mit  $57,1 \pm 3,40$  s beziffert werden - sie war damit hochsignifikant größer im Vergleich zum vertrauten Objekt ( $P < 0,001$ ; Student's t-Test).

Unter Einsatz eines Verzögerungsintervalls von 50 min konnte somit eine Kontrollbedingung geschaffen werden, in welcher die Versuchstiere zwischen zwei präsentierten Objekten zugunsten des neuartigen diskriminieren können.

### 3.1.3.1.3. Testung der Objektwiedererkennung bei Änderungen des Retentionsintervalls

Im Folgenden wurden Bedingungen geschaffen, bei der die Kontrolltiere keine Gedächtnisleistung abrufen können, beispielsweise durch die Verlängerung des Retentionsintervalls. In der Regel verlieren Nager ihre Diskriminationsleistung mit der Verlängerung des zeitlichen Abstandes zwischen erstmaliger Präsentation der Objekte und Prüfung auf Wiedererkennung (Dere et al., 2007). Verzögerungsintervalle, welche keine Wiedererkennung ermöglichen, können in nachfolgenden Untersuchungen eingesetzt werden, um einen möglichen kognitionssteigernden Effekt einer Intervention, beispielsweise durch den Einsatz von Pharmaka oder körperlichem Training, zu ermitteln. In Pilotexperimenten wurde der zeitliche Abstand zwischen beiden Versuchsdurchgängen auf 3 h verzögert. **Abbildung 3.22** gibt die Diskriminationsleistung der Versuchstiere nach einem dreistündigen Verzögerungsintervall wieder.

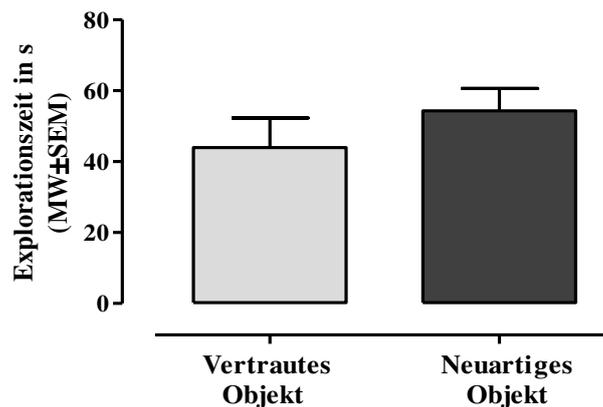


**Abbildung 3. 22:** Graphische Darstellung der Explorationszeiten (s) im Testdurchgang nach 3 h Verzögerungsintervall

Eines der bekannten Objekte aus dem ersten Durchgang wurde im Testdurchgang durch ein neuartiges Objekt ausgetauscht. Es konnte kein signifikanter Unterschied in den Erkundungszeiten zwischen beiden Objekten festgestellt werden ( $P > 0,05$ ; Student's t-Test). Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt ( $n=8$ ).

Zwischen beiden Objekten konnte bei Einsatz eines verlängerten Intervalls von 3 h keine signifikant verschiedene Explorationszeit (in s) im Testdurchlauf ermittelt werden ( $P > 0,05$ ; Student's t-Test). Dies spricht gegen eine Wiedererkennung des bereits präsentierten Objekts und für eine reduzierte Diskriminationsleistung bei Verlängerung des Retentionsintervalls.

Ein zweites Intervall wurde getestet, welches sich nicht durch einen verlängerten Abstand zwischen beiden Durchgängen kennzeichnete, sondern sehr kurz ausgelegt war. Ein zu geringer zeitlicher Abstand zwischen beiden Versuchen kann zu Interferenzen in der Objekterkennung führen und die eindeutige Zuordnung der Gedächtnisinhalte verhindern. **Abbildung 3.23** veranschaulicht die gemessenen Explorationszeiten ( $MW \pm SEM$ ) nach einem 10minütigen Verzögerungsintervall zwischen beiden Versuchsabläufen.



**Abbildung 3. 23:** Graphische Darstellung der Explorationszeiten (s) im Testdurchgang nach 10 min Verzögerungsintervall

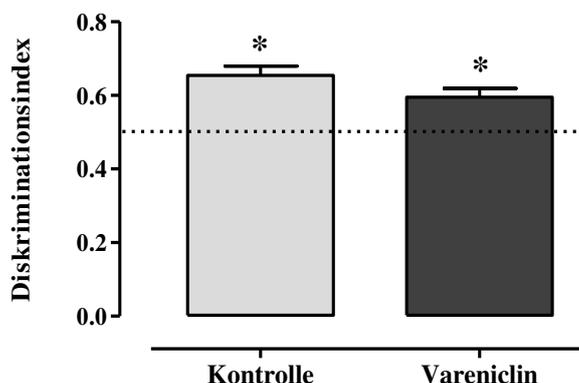
Eines der bekannten Objekte aus dem ersten Durchgang wurde im Testdurchgang durch ein neuartiges Objekt ausgetauscht. Es konnte kein signifikanter Unterschied in den Erkundungszeiten zwischen beiden Objekten festgestellt werden ( $P > 0,05$ ; Student's t-Test). Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt ( $n=8$ ).

Die statistische Auswertung der in **Abbildung 3.23** veranschaulichten Explorationszeiten an beiden Objekten ermittelte einen P-Wert grösser als 0,05 (Student's t-Test). Die Versuchstiere waren demnach nicht in der Lage, zwischen erstmalig und wiederholt präsentem Objekt zu diskriminieren.

### 3.1.3.2. Effekt von Vareniclin auf die Objektwiedererkennung unter Kontrollbedingungen

Zunächst wurde der Einfluss von Vareniclin auf die kognitive Leistung nach einem 50minütigen Retentionsintervall untersucht. Bei diesem gewählten zeitlichen Abstand waren unbehandelte Versuchstiere zur Diskrimination zwischen unbekanntem und neuartigem Objekt fähig (s. **Abbildung 3.21**). Diese Untersuchung diente der Klärung der

Frage, ob Vareniclin unter Kontrollbedingungen eine Verschlechterung der Kognition bewirken kann. Dabei wurde der Diskriminationsindex zu Hilfe gezogen, der die Gesamtexplorationszeit im Offenfeld berücksichtigt (s. 2.6.2.). **Abbildung 3.24** veranschaulicht die graphische Auswertung der Diskriminationsfaktoren von Kontroll- und Verumgruppe.



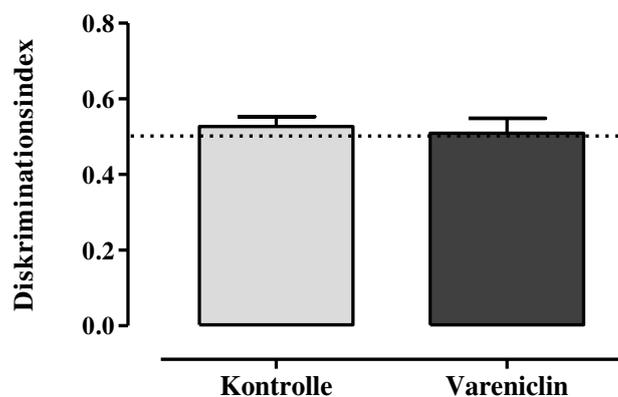
**Abbildung 3.24:** Graphische Darstellung der Diskriminationsindexe im Testdurchgang nach einem Verzögerungsintervall von 50 min

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen charakterisiert werden ( $P > 0,05$ ; Student's t-Test). Signifikante Unterschiede sowohl der Kontrollgruppe als auch nach Vareniclinintervention konnten im Vergleich zu 0,5 festgestellt werden ( $P < 0,05$ ; One-sample t-Test). Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt ( $n=6-10$ ). \*signifikanter Unterschied zum Testwert 0,5. Die gestrichelte Linie kennzeichnet den Testwert 0,5.

Der statistische Vergleich zu 0,5 beruht auf der Festlegung, dass ein DI von 0,5 kein Wiedererkennen bedeutet, Werte signifikant grösser als 0,5 hingegen Diskriminierung des bekannten Objektes bedingen. Sowohl für die Kontrollgruppe als auch für die Tiere, welche Vareniclin über das Trinkwasser verabreicht bekamen (s. 2.2.1.), konnte eine Diskriminationsleistung nach 50 min abgerufen werden ( $DI > 0,5$ ,  $P < 0,05$ ; One-sample t-Test). Die statistische Testung der Diskriminationsindexe der Kontrollgruppe und Vareniclin-behandelten Tiere bewies keine Signifikanz ( $P > 0,05$ ; Student's t-Test). Dies spricht für die Bildung eines Gedächtnisinhaltes in beiden Testgruppen und keiner amnestischen Wirkung von Vareniclin unter den gewählten Bedingungen.

### 3.1.3.2.1. Effekt von Vareniclin auf die Objektwiedererkennung bei Änderungen des Retentionsintervalls

Eine Möglichkeit der Erfassung einer potentiell verbesserten Diskriminationsleistung nach Intervention (Pharmaka, körperliches Training) besteht darin, Verzögerungsintervalle zu nutzen, nach welchen die Kontrolltiere keine Objektwiedererkennung aufweisen. Aus diesem Grunde wurden in nachfolgenden Untersuchungen mit Vareniclin die Intervalle 3 h und 10 min verwendet, bei welchem die Kontrolltiere in vorausgegangenen Experimenten keine Wiedererkennung gezeigt hatten. Die folgende Abbildung illustriert die graphische Auswertung der Diskriminationsfaktoren für Vareniclin-behandelte Versuchstiere sowie für die unbehandelte Kontrollgruppe nach einem Verzögerungsintervall von 3 h. Im Unterschied zum 50 min Intervall waren die Kontrolltiere zu keiner Diskriminationsleistung zwischen beiden Objekten fähig. Inwiefern eine Vorbehandlung mit Vareniclin über das Trinkwasser die Herstellung der Wiedererkennung zu fördern vermochte, ist in **Abbildung 3.25** veranschaulicht.



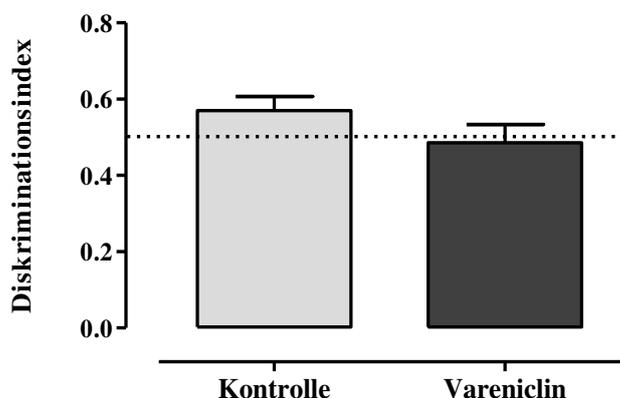
**Abbildung 3. 25:** Graphische Darstellung der Diskriminationsindexe im Testdurchgang nach 3 h Verzögerungsintervall in Kontroll- und Verumgruppe

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen dargestellt werden ( $P > 0,05$ ; Student's t-Test). Kein signifikanter Unterschied der Kontrollgruppe und nach Vareniclinintervention konnte im Vergleich zu 0,5 festgestellt werden ( $P > 0,5$ ; One-sample t-Test). Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt ( $n=7-8$ ). Die gestrichelte Linie kennzeichnet den Testwert 0,5.

Der statistische Vergleich der Diskriminationsfaktoren beider Versuchsgruppen veranschaulichte keine Signifikanz nach einem dreistündigen Retentionsintervall im Testdurchlauf ( $P > 0,05$ ; Student's t-Test). Auch wurden die Diskriminationsindexe nicht

signifikant verschieden zu 0,5 ermittelt ( $P > 0,05$ ; One-sample t-Test). Vareniclin war demnach nicht zu einer Wiederherstellung der unter Kontrollbedingungen eingeschränkten Kognitionsleistung fähig.

Der potenziell kognitionsverbessernde Einfluss von Vareniclin wurde ebenfalls nach einem 10minütigen zeitlichen Abstand zwischen erstmaliger und wiederholter Objektpräsentation untersucht. **Abbildung 3.26** veranschaulicht den Vergleich der Diskriminationsindexe zwischen Kontroll- und Verumgruppe nach einem Retentionsintervall von 10 min.



**Abbildung 3.26:** Graphische Darstellung der Diskriminationsindexe im Testdurchgang nach 10 min Verzögerungsintervall

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen dargestellt werden ( $P > 0,05$ ; Student's t-Test). Es konnte kein signifikanter Unterschied sowohl der Kontrollgruppe als auch der Vareniclinintervention im Vergleich zu 0,5 festgestellt werden ( $P > 0,5$ ; One-sample t-Test). Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt ( $n=8-9$ ). Die gestrichelte Linie kennzeichnet den Testwert 0,5.

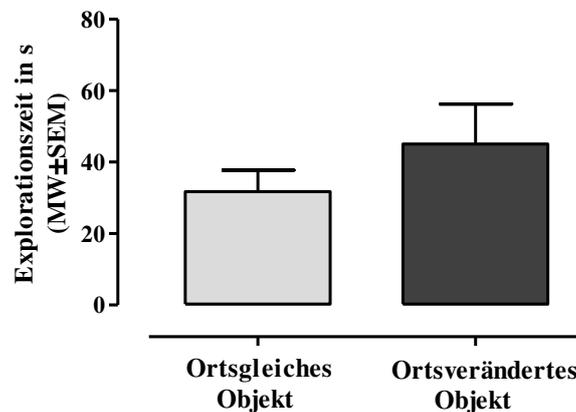
Es konnte kein signifikanter Unterschied nach Vergleich beider Diskriminationsindexe (Kontrollgruppe, Verumgruppe) gegen den Testwert 0,5 ermittelt werden ( $P > 0,05$ ; One-sample t-Test). Auch zwischen beiden Testgruppen fiel der statistische Test nicht signifikant aus ( $P > 0,05$ ; Student's t-Test). Aus diesem Grund kann für die Behandlung mit Vareniclin auch bei einem sehr verkürzten Intervall von 10 min kein promnestischer Einfluss geltend gemacht werden.

### 3.1.3.3. Effekt von Vareniclin auf das räumliche Objektgedächtnis

Eine Abwandlung des *Novelty preference paradigm* (Dere et al., 2007) erfasst das Vermögen der Nagetiere, Änderungen der räumlichen Anordnung von Objekten zu erfassen. Die räumliche Gedächtnisleistung wird über einen intakten Hippocampus vermittelt (Broadbent et al., 2004). Für diese Form der modifizierten Objekterkennung - räumliche Objektwiedererkennung - wurde keines der Objekte ausgetauscht, sondern die Platzierung eines der Objekte im Offenfeld verändert (s. **Abbildung 2.4**). Falls die Tiere das Objekt in der neuen Position verstärkt explorierten, weist dies auf räumliche Wiedererkennung des Objektes hin (Dere et al., 2005; Dere et al., 2007).

#### 3.1.3.3.1. Testung des räumlichen Objektgedächtnisses unter Kontrollbedingungen

Pilotuntersuchungen dienten der Aufklärung der Fragestellung, ob nach einem gewählten Retentionsintervall von 50 min eine Diskriminationsleistung der Kontrolltiere beobachtet werden kann. **Abbildung 3.27** veranschaulicht die ermittelten Explorationszeiten, die nach einem 50minütigen Abstand zwischen den Versuchsdurchgängen ermittelt wurden.



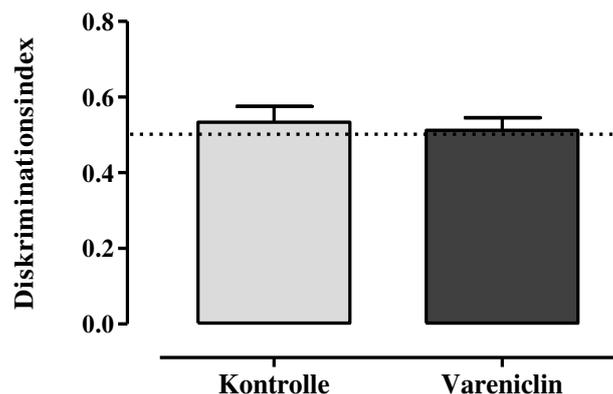
**Abbildung 3. 27:** Graphische Darstellung der Explorationszeiten (s) im Testdurchgang nach 50 min Verzögerungsintervall

Die Position eines der Objekte aus dem ersten Durchgang wurde im Testdurchgang verändert. Es konnte kein signifikanter Unterschied in den Erkundungszeiten zwischen beiden Objekten festgestellt werden ( $P > 0,05$ ; Student's t-Test). Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt ( $n=8$ ).

Die gemessenen Explorationszeiten verdeutlichten keine signifikant verlängerte Erkundungsdauer am Objekt in der neuartigen Position nach 50 min, wohl aber einen eindeutigen Trend ( $P > 0,05$ ; Student's t-Test). Dies mag an der stark unterschiedlichen Explorationsneigung innerhalb des Versuchssets und damit verbundenen hohen Streuungsparametern liegen. Die Auswertung der Diskriminationsfaktoren ergab einen durchschnittlichen Wert von  $0,57 \pm 0,03$ . Ein statistischer Vergleich des Diskriminationsindex versus 0,5 zeigte eine Signifikanz nach einem 50minütigen Verzögerungsintervall ( $P < 0,05$ ; One-sample t-Test). Dies deutet auf räumliche Objektwiedererkennung hin.

### 3.1.3.3.2. Effekt von Vareniclin auf das räumliche Objektgedächtnis bei Änderungen des Retentionsintervalls

Bedingungen wurden geschaffen, die zu einem Verlust der kognitiven Leistung führten, um in Anschluss diese mittels Intervention zu verbessern. Der zeitliche Abstand zwischen beiden Versuchsdurchgängen wurde auf 3 h ausgeweitet. Im Unterschied zum 50 min Intervall veranschaulichten Pilotexperimente keine Diskriminationsleistung der Kontrolltiere nach 3 h. Zur Überprüfung eines prokognitiven Effekts auf das räumliche Objektgedächtnis wurden Versuchstiere einer Vorbehandlung mit Vareniclin unterzogen. **Abbildung 3.28** illustriert die ermittelten Diskriminationsfaktoren der untersuchten Tiergruppen.



**Abbildung 3.28:** Graphische Darstellung der Diskriminationsfaktoren im Testdurchgang nach 3 h Verzögerungsintervall

Es konnte kein signifikanter Unterschied in den Diskriminationsfaktoren zwischen Kontroll- und Verumgruppe festgestellt werden ( $P > 0,05$ ; Student's t-Test). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und Verumgruppe im Vergleich zu 0,5 festgestellt werden ( $P > 0,5$ ; One-sample t-Test). Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt ( $n=8-9$ ). Die gestrichelte Linie kennzeichnet den Testwert 0,5

Infolge der Vorbehandlung mit Vareniclin konnte nach 3 h Verzögerungsintervall keine signifikante Veränderung des Diskriminationsindexes beobachtet werden ( $P > 0,05$ ; Student's t-Test). Der statistische Vergleich zu 0,5 fiel in beiden Versuchsgruppen nicht signifikant verschieden aus ( $P > 0,05$ ; One-sample t-Test). Für Vareniclin kann demnach kein Einfluss auf die Wiederherstellung des räumlichen Objektgedächtnisses geltend gemacht werden.

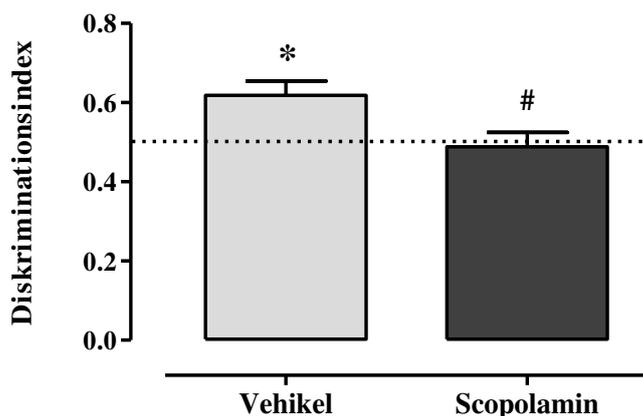
#### **3.1.3.4. Effekt von Vareniclin bei Anwendung eines pharmakologisch-induzierten Defizitmodells**

Eine Möglichkeit der Erfassung einer potentiell verbesserten Objektwiedererkennung nach Intervention besteht darin, Verzögerungsintervalle zu nutzen, nach welchen die Kontrolltiere keine Wiedererkennung aufweisen (s. **3.1.3.2.1.**). Alternativ zur Testung promnestischer Substanzen bei verschiedenen Retentionsintervallen können deren Effekte auf eine Pharmakon-induzierte beeinträchtigte Kognition beurteilt werden (de Bruin & Pouzet, 2006; Botton et al., 2010; Han et al., 2012). Als Substanz, die mit einem kognitiven Defizit nach Verabreichung einhergeht, wurde Scopolamin für nachfolgende Untersuchungen ausgewählt. Scopolamin vermag die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und stellt einen klassischen Antagonisten am muskarinischen Acetylcholinrezeptor dar.

##### **3.1.3.4.1. Testung des pharmakologisch-induzierten Defizitmodells**

In Kochsalzlösung gelöstes Scopolamin wurde in einer Einzeldosis von 0,5 mg/kg 90 min vor Versuchsbeginn intraperitoneal verabreicht. Als Vehikel fand sterile Kochsalzlösung Verwendung. Dabei wurde in der Vorbereitung der Versuchstiere sowie in der Durchführung der Kognitionsexperimente, wie in Kapitel **2.6** beschrieben, verfahren. **Abbildung 3.29** veranschaulicht die Diskriminationsfaktoren der Vehikel- und Scopolamin-behandelten Versuchstiergruppen im Testdurchlauf.

Für die Vehikelgruppe konnte ein signifikanter Unterschied zum Testwert 0,5 (Objektdiskriminierung) ermittelt werden ( $P < 0,05$ , One-sample t-Test). Der bedeutende statistische Vergleich zwischen Vehikel- und Scopolaminintervention veranschaulichte einen signifikant niedrigeren Diskriminationsfaktor in den Scopolamin-behandelten Tieren ( $P < 0,05$ , Student's t-Test).



**Abbildung 3.29:** Graphische Darstellung der Diskriminationsfaktoren im Testdurchgang nach 50 min Verzögerungsintervall

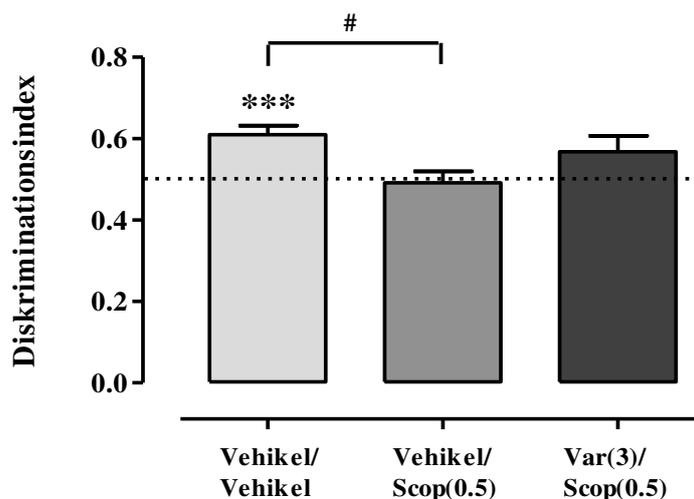
Die Vehikelgruppe zeigte einen signifikanten Unterschied sowohl zur Scopolamingruppe als auch zum Testwert 0,5 ( $P < 0,5$ ). Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt ( $n=6-7$ ). Die gestrichelte Linie kennzeichnet den Testwert 0,5. \*signifikanter Unterschied zu 0,5. #signifikanter Unterschied zu Vehikel

Dieser Befund war in Einklang mit Literaturdaten, die eine amnestische Wirkung von Scopolamin in Dosen von 0,3-1 mg/kg in Mäusen unter Anwendung eines einstündigen Retentionsintervalls demonstrierten (Bertaina-Anglade et al., 2006).

Dieses pharmakologisch-induzierte Defizitmodell diente in nachfolgenden Experimenten als Ausgangsbasis, um den Einfluss von Vareniclin auf das Scopolamin-induzierte kognitive Defizit zu evaluieren.

#### 3.1.3.4.2. Effekt von Vareniclin auf das Scopolamin-induzierte Defizit bei Objektwiedererkennung

In dem vorangegangenen Experiment (s. **Abbildung 3.29**) konnte Scopolamin als Substanz mit einem kognitionsverschlechternden Einfluss charakterisiert werden. Im Folgenden wurde der Fragestellung nachgegangen, inwiefern Vareniclin den Effekt von Scopolamin zu kompensieren vermag. Für die Durchführung dieses Experimentes bekamen die Versuchstiere über mehrere Wochen Vareniclin über das Trinkwasser zugesetzt und wurden 90 min vor Versuchsbeginn einer zusätzlichen Scopolamininjektion unterzogen. Die Auswertung der Explorationsszeiten über den Diskriminationsindex im Vergleich zu den ermittelten Daten nach alleiniger Scopolamin- oder Vehikelgabe ist in der folgenden Abbildung (**Abbildung 3.30**) illustriert.



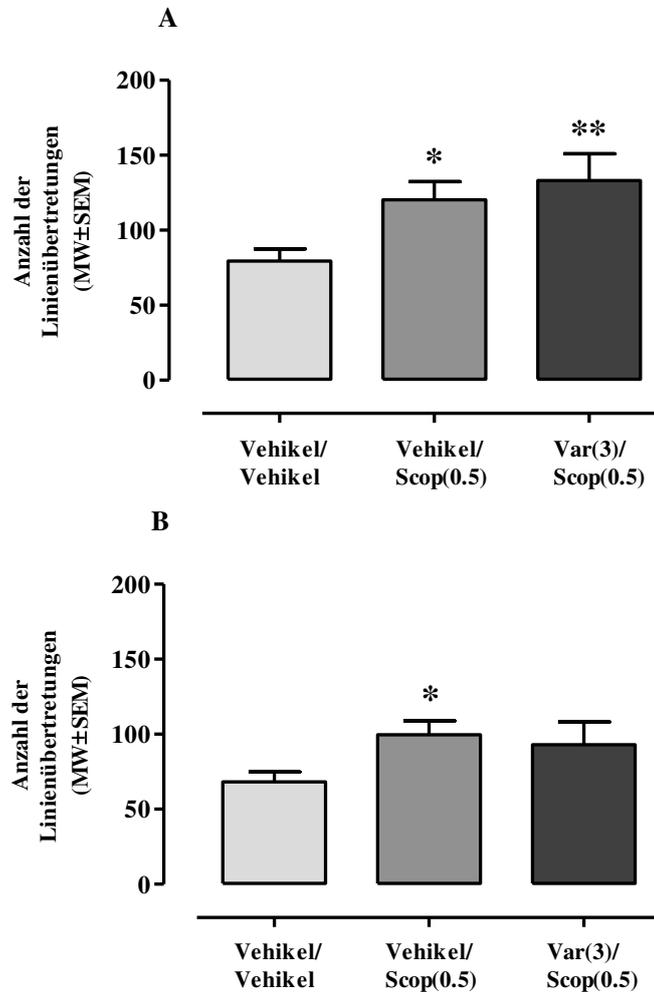
**Abbildung 3. 30:** Graphische Darstellung der Diskriminationsfaktoren im Testdurchgang  
 Bezeichnungen: Vehikel/Vehikel: Gabe von Trinkwasser (pH 3, entkeimt) und intraperitoneale Vehikelinjektion. Vehikel/Scop(0,5): Gabe von Trinkwasser (pH 3, entkeimt) und intraperitoneale Scopolamininjektion in einer Dosierung von 0,5 mg/kg. Var(3)/Scop(0,5): Gabe von Vareniclin in Trinkwasser (pH 3, entkeimt) in einer Tagesdosierung von 3 mg/kg, zusätzlich intraperitoneale Scopolamininjektion in einer Dosierung von 0,5 mg/kg. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt (n=10-12). Die gestrichelte Linie kennzeichnet den Testwert 0,5. \*\*\*signifikanter Unterschied zu 0,5 ( $P < 0,001$ ), #signifikanter Unterschied ( $P < 0,05$ )

Der statistische Vergleich der untersuchten Versuchsgruppen ermittelte einen signifikanten Unterschied zwischen der Vehikel- und der Scopolaminintervention ( $P = 0,01$ ; Student's t-Test). Die Analyse brachte keine Signifikanz zwischen der Scopolaminintervention und additiver Vareniclin- und Scopolaminverabreichung zum Vorschein ( $P > 0,05$ ). Derselbe statistische Vergleich führte zu dem Ergebnis, dass kein signifikanter Unterschied zwischen der Versuchstiergruppe, die Vareniclin und Scopolamin additiv verabreicht bekam, und der Vehikelgruppe ermittelt werden konnte. Die Vehikelintervention führte zu einem hochsignifikanten Unterschied versus dem Testwert 0,5 ( $P < 0,001$ ; One-sample t-Test).

### 3.1.3.4.3. Effekte auf die Lokomotion bei Anwendung des pharmakologisch-induzierten Defizitmodells

In der gängigen Literatur sind Effekte von Scopolamin auf die lokomotorische Aktivität in C57BL/6-Mäusen beschrieben (Dodart et al., 1997; de Bruin & Pouzet, 2006). Die folgende Untersuchung diente der Überprüfung, ob die Intervention mit Scopolamin (0,5

mg/kg) und additiver Vareniclinbehandlung (3 mg/kg/d) zu einer signifikanten Änderung der Mobilität der Versuchstiere führte. **Abbildung 3.31** charakterisiert die Anzahl der Linienübertretungen (s. 2.6.2.), die in den verschiedenen Versuchsgruppen ermittelt wurden.



**Abbildung 3.31:** Anzahl der Linienübertretungen infolge der Intervention mit Vehikel, Scopolamin, Scopolamin und Vareniclin

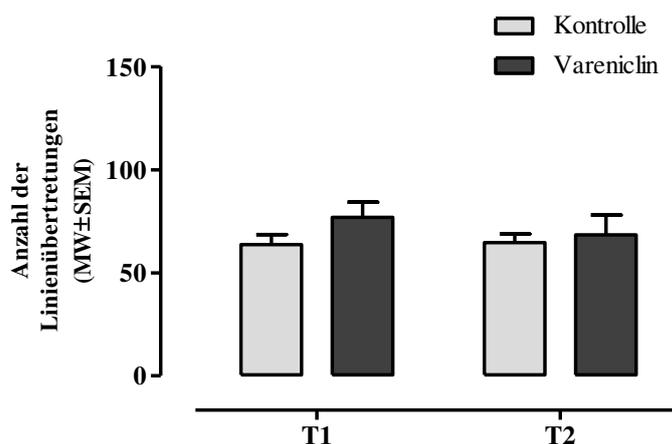
Bezeichnungen: Vehikel/Vehikel: Gabe von Trinkwasser (pH 3, entkeimt) und intraperitoneale Vehikelinjektion. Vehikel/Scop(0,5): Gabe von Trinkwasser (pH 3, entkeimt) und intraperitoneale Scopolamininjektion in einer Dosierung von 0,5 mg/kg. Var(3)/Scop(0,5): Gabe von Vareniclin in Trinkwasser (pH 3, entkeimt) in einer Tagesdosierung von 3 mg/kg, zusätzlich intraperitoneale Scopolamininjektion in einer Dosierung von 0,5 mg/kg. **A** 1. Versuchsdurchgang. **B** Testdurchgang. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt (n=10-12). \*signifikanter Unterschied zu Vehikel (P<0,05). \*\*signifikanter Unterschied (P<0,01)

Im ersten Versuchsdurchgang (s. **Abbildung 3.31 A**) ermittelte die statistische Auswertung signifikante Unterschiede bei der Anzahl der Linienübertretungen zwischen der Vehikelgruppe und den Versuchstiergruppen, die Scopolamin oder Vareniclin und

Scopolamin additiv verabreicht bekamen ( $P < 0,05$ ; Student's t-Test). Auch im Testdurchgang (**B**) konnte durch die Scopolaminintervention eine Hyperlokomotion verzeichnet werden ( $P < 0,05$ ). Die mit Vareniclin vorbehandelte Verumgruppe, die ebenfalls eine Scopolamininjektion verabreicht bekam, zeigte einen eindeutigen Trend in Richtung einer gesteigerten Mobilität im Versuch. Der P-Wert wurde mit 0,07 ermittelt.

### 3.1.3.4.3.1. Effekt von Vareniclin auf die Lokomotion

Im folgenden Abschnitt wurde der Einfluss von Vareniclin auf die Lokomotion beurteilt. Dies diente der Bestimmung der generellen Mobilität der Versuchsmäuse unter Kontrollbedingungen und nach Vareniclinbehandlung. Inwiefern die Vorbehandlung mit Vareniclin eine Hyperlokomotion bewirkte, ist in **Abbildung 3.32** illustriert.



**Abbildung 3. 32:** Anzahl der Linienübertretungen infolge Vehikel- und Vareniclinintervention **T1:** 1. Versuchsdurchgang. **T2:** Testdurchgang. Das Verzögerungsintervall zwischen beiden Durchgängen betrug 50 min. Es konnte kein Einfluss von Vareniclin (3 mg/kg/d) auf die Lokomotion festgestellt werden ( $P > 0,05$ ). Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt (n=6-9).

Vareniclin via Trinkwasser verursachte keinen Effekt auf die Laufdistanz über einen Zeitverlauf von 10 min. Obgleich im ersten Intervall (T1) ein möglicher Trend Richtung Hyperlokomotion durch Vareniclin sichtbar wird, konnte in keinem der Versuchsdurchläufe (T1, T2) ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen erzielt werden ( $P > 0,05$ ; Student's t-Test).

### 3.2. Effekte von körperlichem Training

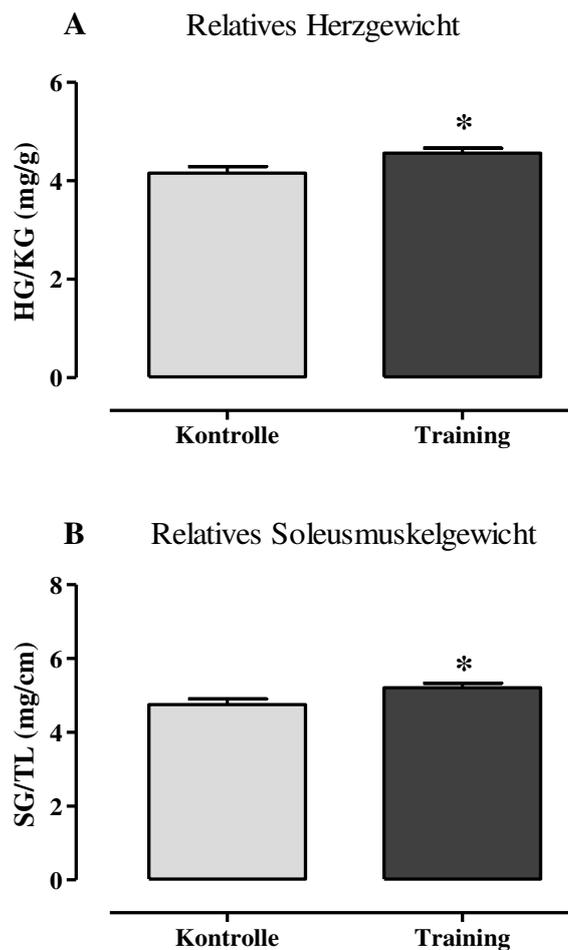
Sowohl humane als auch Tierstudien der vergangenen zwei Jahrzehnte belegen einen Nutzen körperlichen Trainings für kognitive Funktionen (Kramer et al., 1999; Winter et al., 2007; van Praag, 2009). Dabei werden Neurotransmittern und Wachstumsfaktoren, beispielsweise BDNF, Schlüsselrollen zugewiesen (Vaynman et al., 2004b). Bislang war ebenfalls bekannt, dass körperliche Aktivität die endotheliale NO-Bildung über eine verstärkte Expression und Aktivität der NOS im Gefäßsystem beeinflusst (Kojda & Hambrecht, 2005).

In der folgenden Studie wurde die Fragestellung untersucht, ob die Aktivierung des NO/cGMP-Signalweges im Zusammenspiel mit nAChR oder BDNF für die positiven Effekte von körperlichem Training von Bedeutung ist. Dafür wurden C57BL/6-Mäuse und eNOS<sup>-/-</sup>-Mäuse zunächst einem körperlichen Training unterzogen. Anschließend erfolgten die Evaluierung der organspezifischen Proteinexpression (eNOS, BDNF,  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR) und die Untersuchung der Objektwiedererkennung.

#### 3.2.1. Trainingseffizienz

Die Effizienz des dreiwöchigen körperlichen Trainings (s. 2.2.3) wurde anhand anatomischer Kenngrößen beurteilt. Nach Euthanasie des Versuchstieres erfolgte zunächst die Bestimmung des Herz-, Körper- und Soleusmuskelgewichtes, sowie die Messung der Tibialänge. Folgende Abbildung (**Abbildung 3.33**) kennzeichnet sowohl relatives Herzgewicht als auch relative Soleusmuskelmasse.

Körperliches Training induzierte eine Herzhypertrophie im Vergleich zum ruhenden Kontrolltier ( $P < 0,05$ , Student's t-Test) (s. **Abbildung 3.33 A**). Dafür wurde das Herzgewicht auf die Körpermasse bezogen. Zur Erfassung der peripheren Muskelmasse erfuhr das Soleusmuskelgewicht eine Standardisierung auf die Tibialänge. Eine signifikante periphere Muskelzunahme konnte in den Trainingstieren im Vergleich zu den Kontrollen ermittelt werden ( $P < 0,05$ , Student's t-Test) (s. **Abbildung 3.33 B**).



**Abbildung 3.33:** **A** Relatives Herzgewicht. Das Herzgewicht (HG) wurde auf das Körpergewicht (KG) normalisiert. Es konnte eine Trainings-induzierte Herzhypertrophie ermittelt werden. **B** Relatives Soleusmuskelgewicht. Das Soleusmuskelgewicht (SG) wurde auf die Tibialänge (TL) bezogen. Es konnte eine Zunahme der Soleusmuskelmasse errechnet werden. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt (n=6-14). \*signifikanter Unterschied zur Kontrolle (P<0,05; Student's t-Test)

Durch den Nachweis der Trainings-induzierten Herzhypertrophie und quantitativen Muskelzunahme konnte die Effizienz des körperlichen Trainings validiert werden.

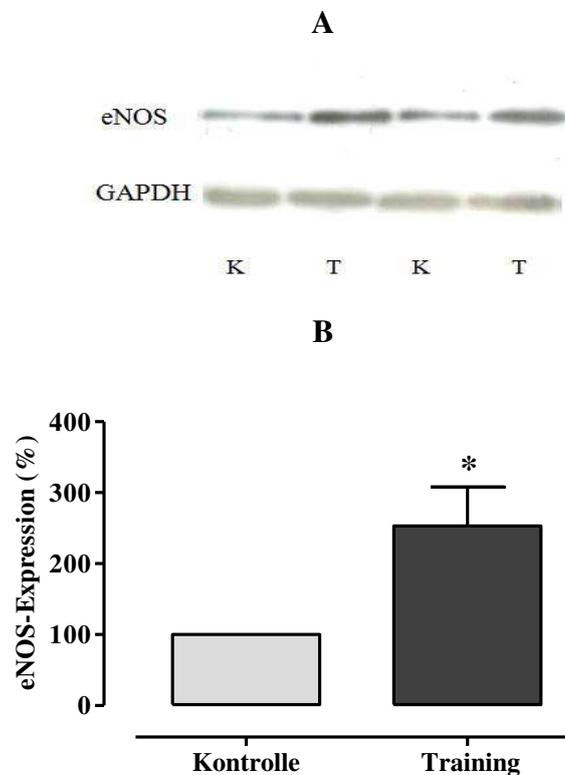
### 3.2.2. Effekt des körperlichen Trainings auf die Proteinexpression

Die Analyse der Proteinexpression erfolgte in Homogenaten der Aorta, des Hippocampus und des präfrontalen Cortex mittels Western-Blot (s. 2.4.4). Diese Untersuchung diente der Aufklärung der Fragestellung, ob körperliches Training die Expression von Proteinen organspezifisch regulierte. C57BL/6-Mäuse wurden dafür einem erzwungenen

körperlichen Training unterzogen; anschließend wurde die Expression der eNOS (s. 3.2.2.1), des  $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptors (s. 3.2.2.2.) und des BDNF (s. 3.2.2.3.) evaluiert.

### 3.2.2.1. Effekt des körperlichen Trainings auf die Expression der eNOS

NO werden vasoprotektive Effekte zugesprochen (Gewaltig & Kojda, 2002). Es ist hinreichend bekannt, dass infolge körperlichen Trainings die eNOS zu einer verstärkten Expression und Phosphorylierung an Ser-1177 stimuliert wird (Kojda & Hambrecht, 2005). **Abbildung 3.34** kennzeichnet die Regulation der eNOS-Expression nach körperlichem Training in der Aorta.

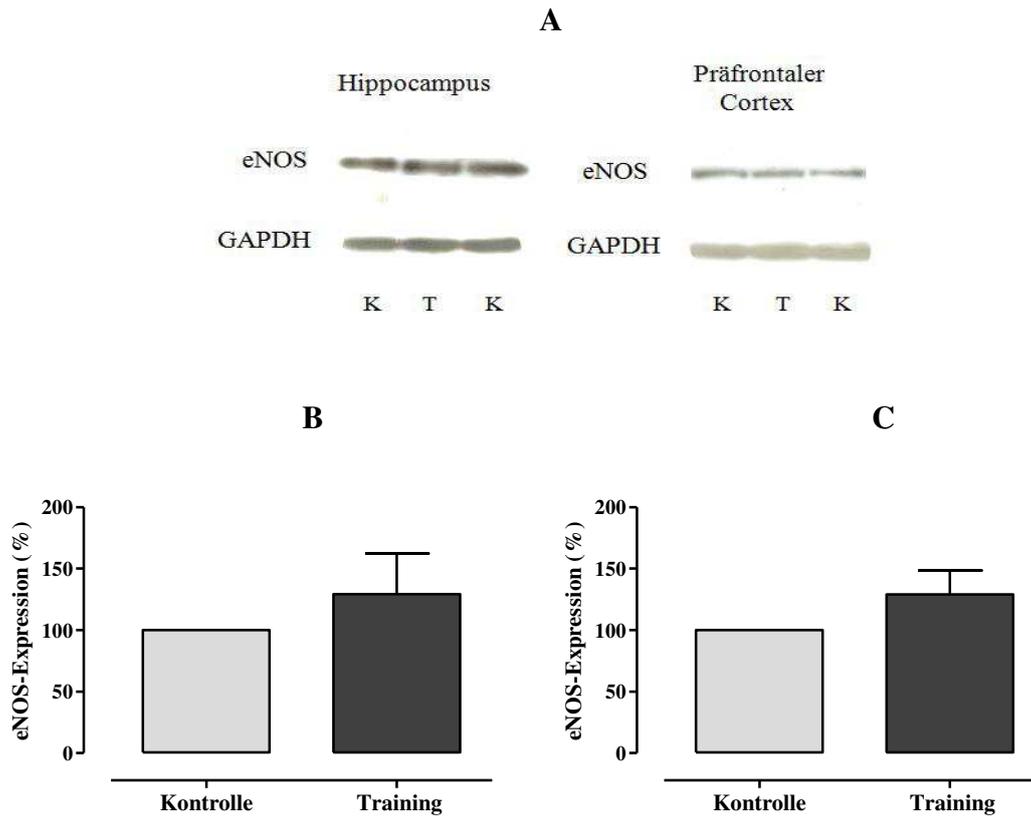


**Abbildung 3.34:** Quantitative Evaluierung der eNOS-Expression in der Aorta

**A** Repräsentativer Western-Blot der eNOS-Expression in Aortengewebe nach dem erzwungenen Training im Vergleich zur Kontrolle. K=Kontrolle, T=Training. **B** Es konnte eine signifikant veränderte eNOS-Expression nach dem erzwungenen Training ermittelt werden. Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt (n=5-6). (Kontrolle=100%; die Säule ist repräsentativ für alle Kontrollen). \*signifikanter Unterschied zur Kontrolle (P<0,05; Student's t-Test)

Nach Beendigung des erzwungenen Trainings konnte eine signifikante Hochregulation der eNOS in der Aorta beobachtet werden (P<0,05; Student's t-Test). Damit sind die in der Aorta ermittelten Daten einer Trainings-induzierten eNOS-Hochregulation im Einklang

mit bereits publizierten Daten (Dao et al., 2011). Es war anzunehmen, dass vasoprotektive Trainingseffekte auch im cerebralen Gefäßsystem wirken. Bislang war jedoch wenig bekannt zum Effekt körperlichen Trainings auf die Expression der eNOS im Gehirngewebe. Aus diesem Grund wurden Untersuchungen hinsichtlich der eNOS-Expression im Hippocampus und präfrontalen Cortex von C57BL/6-Mäusen durchgeführt. **Abbildung 3.35** illustriert deren graphische Auswertung in trainierten versus untrainierten Kontrolltieren.



**Abbildung 3.35:** Quantitative Evaluierung der eNOS-Expression im Hippocampus und im präfrontalen Cortex

**A** Repräsentative Western-Blots der eNOS-Expression in Hippocampus- und Cortextgewebe nach dem erzwungenen Training im Vergleich zur Kontrolle. K=Kontrolle, T=Training. Es konnte keine signifikant veränderte eNOS-Expression nach dem erzwungenen Training ermittelt werden ( $P>0,05$ ; Student's t-Test), weder im Hippocampus (**B**), noch im präfrontalen Cortex (**C**). Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt ( $n=6$ ). (Kontrolle=100%; die Säule ist repräsentativ für alle Kontrollen).

Weder im Hippocampus noch im präfrontalen Cortex konnte eine erhöhte Expression der eNOS bei den Tieren gefunden werden, welche ein mehrwöchiges körperliches Training erfuhren ( $P>0,05$ ; Student's t-Test). Diese Daten sind in Kontrast zu den in **Abbildung 3.34** präsentierten Ergebnissen aus der Aorta.

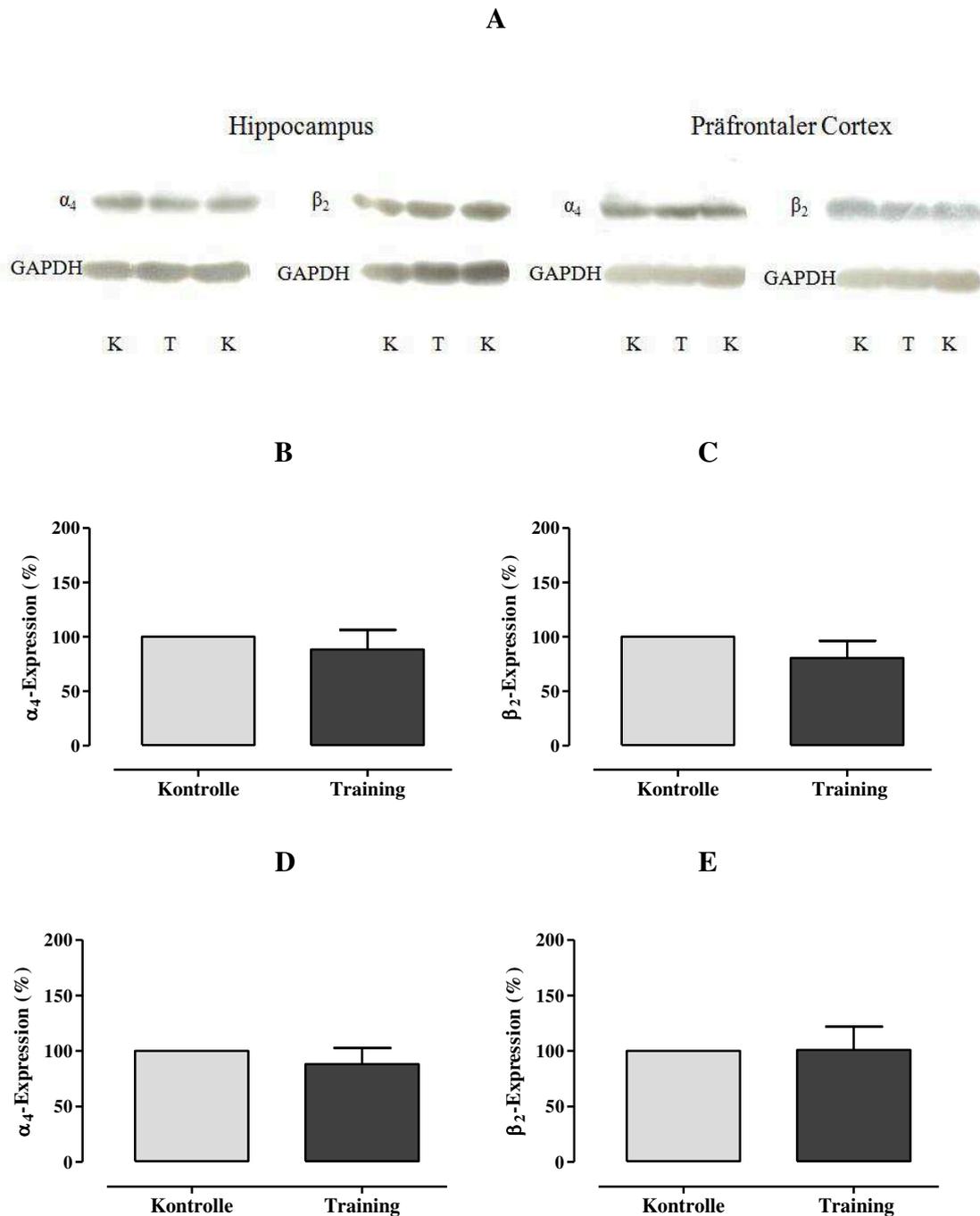


Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression beider Untereinheiten des nAChR nach Training beobachtet werden ( $P > 0,05$ ; Student's t-Test). Demnach muss vermutet werden, dass die Trainings-induzierten vaskulären Adaptationen in der Aorta ohne Beteiligung des  $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptor einhergehen.

Hingegen bestehen Hinweise darauf, dass nAChRs an der zentralen NO-Generierung beteiligt sind (Zayas et al., 2002; Papadopoulou et al., 2004). Aus diesem Grund wurde die Expression des  $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptors ebenfalls im Gehirngewebe bestimmt. Hierfür wurden der Hippocampus und der präfrontale Cortex aus trainierten und ruhenden C57BL/6-Mäusen präpariert. Nachfolgend erfolgte die Evaluation der  $\alpha_4$ - und  $\beta_2$ -Untereinheiten des nAChR in den genannten Gehirnstrukturen.

**Abbildung 3.37** illustriert die graphische Auswertung der  $\alpha_4\beta_2$ -Expression im Gehirn von trainierten versus untrainierten Tieren. Es konnte keine signifikante Veränderung der nAChR-Expression im Hippocampus nach dem erzwungenen Training ermittelt werden ( $P > 0,05$ ; Student's t-Test), weder für die  $\alpha_4$ - (s. **Abbildung 3.37 B**) noch für die  $\beta_2$ -Untereinheit (s. **Abbildung 3.37 C**). Der statistische Vergleich beider Untereinheiten fiel auch im präfrontalen Cortex nicht signifikant verschieden zwischen trainierten und ruhenden Kontrolltieren aus ( $P > 0,05$ ; Student's t-Test) (s. **Abbildung 3.37 D**, **Abbildung 3.37 E**).

Daher muss vermutet werden, dass die positiven Effekte von körperlichem Training ohne Beteiligung des nAChR ablaufen.

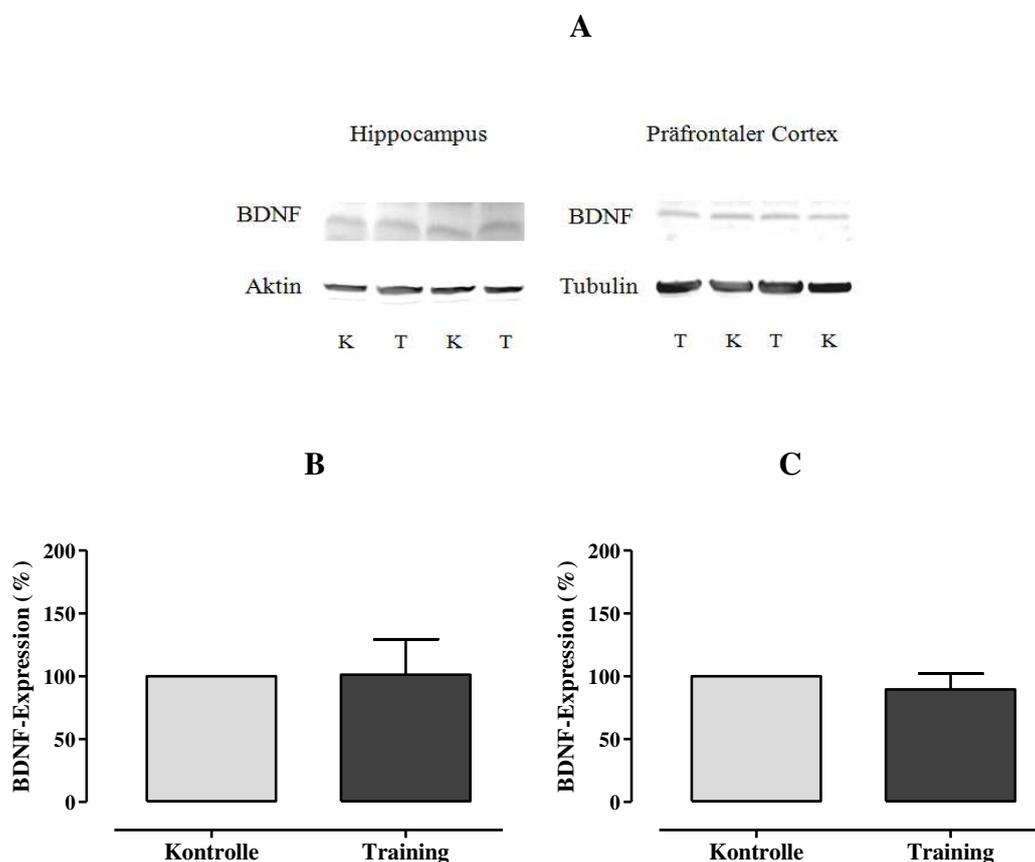


**Abbildung 3.37:** Quantitative Evaluierung der  $\alpha_4\beta_2$ -Expression im Hippocampus und im präfrontalen Cortex nach körperlichem Training.

**A** Repräsentative Western-Blots der  $\alpha_4\beta_2$ -Expression in Hippocampus- und Cortexgewebe nach dem erzwungenen Training im Vergleich zur Kontrolle. K=Kontrolle, T=Training. **B, C** Es konnte keine signifikante Veränderung der nAChR-Expression im Hippocampus nach dem erzwungenen Training ermittelt werden ( $P > 0,05$ ; Student's t-Test). **D, E** Es konnte keine signifikante Veränderung der nAChR-Expression im präfrontalen Cortex nach dem erzwungenen Training ermittelt werden ( $P > 0,05$ ; Student's t-Test). Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt ( $n=5-6$ ). (Kontrolle=100%; die Säule ist repräsentativ für alle Kontrollen).

### 3.2.2.3. Effekt des körperlichen Trainings auf die Expression des BDNF

BDNF (*Brain derived neurotrophic factor*) gehört zu der Familie der Neurotrophine mit pleiotropen Funktionen im zentralen Nervensystem (Hong et al., 2011). Außerdem werden BDNF modulatorische Effekte hinsichtlich Trainings-induzierter Effekte auf die synaptische Plastizität zugesprochen (Gomez-Pinilla et al., 2002; Vaynman et al., 2004b). Es gibt Hinweise darauf, dass die BDNF-Expression durch körperliches Training reguliert wird (Neeper et al., 1996; O'Callaghan et al., 2007). Zur Aufklärung der Frage, ob sich die BDNF-Spiegel nach Durchführung des gewählten Trainingsprotokolls veränderten, wurden Untersuchungen an Gehirngewebe euthanasierter Trainings- und Kontrolliere durchgeführt. **Abbildung 3.38** illustriert die graphische Auswertung der BDNF-Expression im Hippocampus und präfrontalen Cortex.



**Abbildung 3.38:** Quantitative Evaluierung der BDNF-Expression im Hippocampus und im präfrontalen Cortex nach körperlichem Training

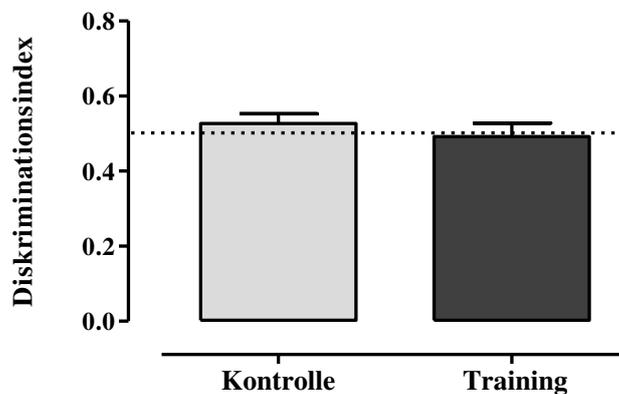
**A** Repräsentative Western-Blots der BDNF-Expression in Hippocampus und Cortex, welche auf Aktin oder Tubulin normalisiert wurden. K=Kontrolle, T=Training. Die statistische Auswertung ermittelte keine signifikant veränderte Expression des BDNF im Hippocampus (**B**) oder präfrontalen Cortex (**C**) nach dem erzwungenen Training im Vergleich zur Kontrolle. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt (n=6). (Kontrolle=100%; die Säule ist repräsentativ für alle Kontrollen).

Die graphische Auswertung ermittelte keine signifikanten Unterschiede zwischen den trainierten und ruhenden Kontrolltieren im Hippocampus und präfrontalen Cortex ( $p > 0,05$ ; Student's T-Test). Aus diesem Grund muss davon ausgegangen werden, dass das verwendete Trainingsprotokoll den BDNF-Spiegel im Gehirn nicht reguliert.

### 3.2.3. Effekt des körperlichen Trainings auf die Objektwiedererkennung

Die folgende Untersuchung diente der Aufklärung der Frage, ob sich körperliches Training auf die Objekterkennung in C57BL/6-Mäusen auswirkt. Die Objektwiedererkennung wurde wie beschrieben durchgeführt (s. 2.6.), nachdem die Versuchstiere einem erzwungenen Trainingsprotokoll mit hoher Intensität zugeführt wurden. Die Trainingseffizienz wurde anhand anatomischer Kenngrößen bestimmt (s. 3.2.1.). Aus vorherigen Experimenten war bekannt, dass ein Retentionsintervall von 3 h zu einem Verlust des Objektgedächtnisses in C57BL/6-Mäusen führte. Dieses Retentionsintervall wurde in der folgenden Untersuchung genutzt, um einen potenziell steigernden kognitiven Einfluss von körperlichem Training zu eruieren.

**Abbildung 3.39** illustriert den Einfluss von körperlichem Training auf den Diskriminationsfaktor nach einem Retentionsintervall von 3 h.



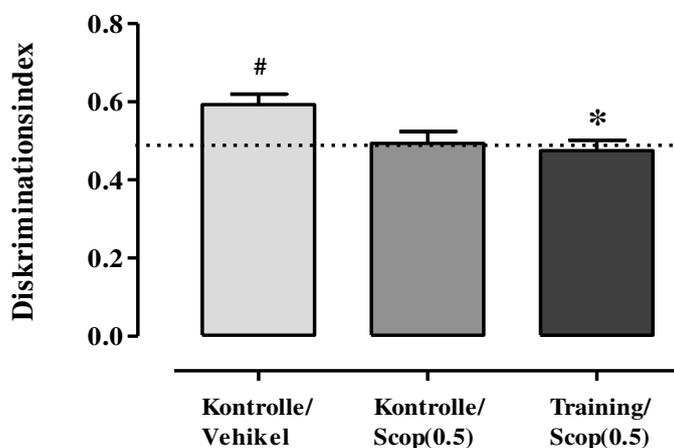
**Abbildung 3.39:** Graphische Darstellung der Diskriminationsindexe im Testdurchgang nach 3 h Verzögerungsintervall

Es konnte kein signifikanter Unterschied in den Diskriminationsfaktoren zwischen Kontroll- und Trainingsgruppe festgestellt werden ( $P > 0,05$ ; Student's t-Test). Es konnte kein signifikanter Unterschied, weder der Kontrollgruppe noch der Trainingsgruppe, zu 0,5 festgestellt werden ( $P > 0,5$ ; One-sample t-Test). Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt ( $n=6-8$ ). Die gestrichelte Linie kennzeichnet den Testwert 0,5.

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den ruhenden und den trainierten Versuchstieren festgestellt werden ( $P > 0,05$ ; Student's t-Test). Auch der statistische Vergleich zu 0,5 fiel nicht signifikant aus ( $P > 0,05$ ; One-sample t-Test). Auf Basis des vorliegenden Studienergebnisses kann somit kein Einfluss von körperlichem Training auf den Erhalt der kognitiven Leistung – Objektwiedererkennung - geltend gemacht werden.

### 3.2.4. Effekt des körperlichen Trainings auf das Scopolamin-induzierte Defizit bei Objektwiedererkennung

Da das körperliche Training nach Ausnutzung eines verlängerten Retentionsintervalls zu keiner verbesserten kognitiven Leistung geführt hatte, wurde im Nachfolgenden untersucht, ob sich mittels Verwendung eines Defizitmodells positive Effekte auf die Kognition bestimmen lassen. Zur Erschaffung eines kognitiven Defizits wurde der muskarinerge AchR-Antagonist Scopolamin intraperitoneal appliziert. **Abbildung 3.40** kennzeichnet den Effekt körperlichen Trainings auf die Scopolamin-induzierte Beeinträchtigung der Kognition.



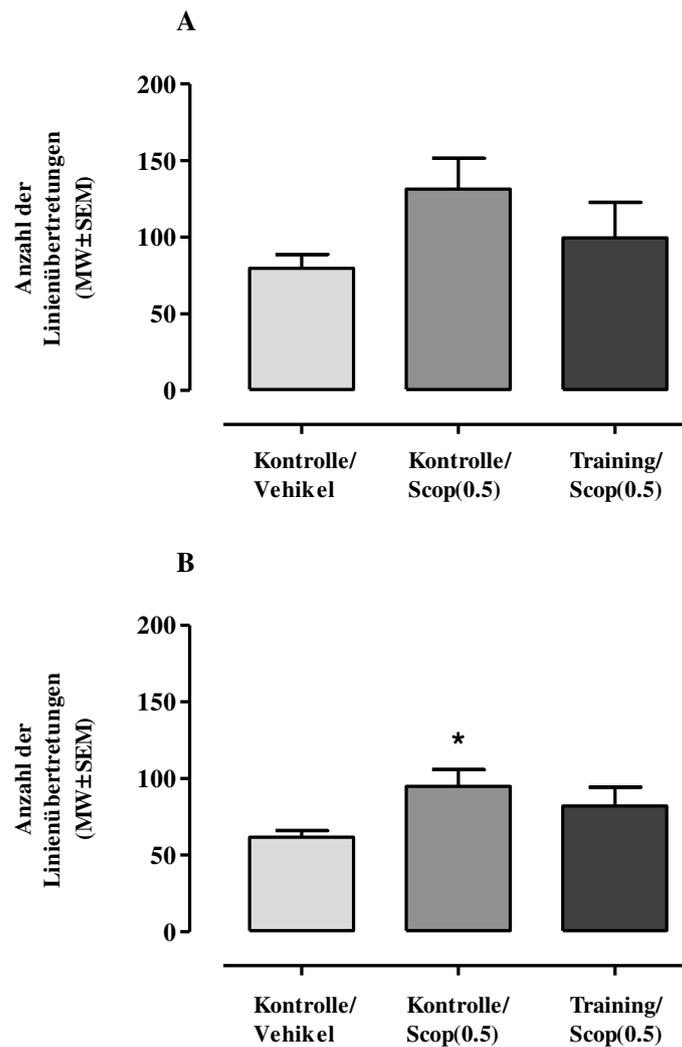
**Abbildung 3.40:** Graphische Darstellung der Diskriminationsfaktoren im Testdurchgang  
 Bezeichnungen: Kontrolle/Vehikel: Ruhende Kontrolltiere, welche eine Vehikelinjektion (0,9% NaCl-Lösung) 90 min vor Versuchsbeginn verabreicht bekamen. Kontrolle/Scop(0,5): Ruhende Kontrolltiere, welche eine intraperitoneale Scopolamininjektion in einer Dosierung von 0,5 mg/kg verabreicht bekamen. Training/Scop(0,5): Trainierte Tiere, welche nach Abschluss des Trainings zusätzlich eine intraperitoneale Scopolamininjektion in einer Dosierung von 0,5 mg/kg verabreicht bekamen. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt (n=6-7). #signifikanter Unterschied zu 0,5 ( $P < 0,05$ ), \*signifikanter Unterschied zur Kontrolle ( $P < 0,05$ ). Die gestrichelte Linie kennzeichnet den Testwert 0,5.

Die statistische Auswertung zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kontrolltieren, welche Scopolamin oder Vehikel verabreicht bekamen, wohl aber einen eindeutigen Trend ( $P > 0,05$ ; Student's t-Test). Ein statistischer Unterschied wurde zwischen den Diskriminationsfaktoren der Vehikelgruppe und der trainierten Versuchstiergruppe, welche mit Scopolamin behandelt worden war, ermittelt ( $P < 0,05$ ; Student's t-Test).

#### **3.2.4.1. Effekte auf die Lokomotion bei Anwendung des pharmakologisch-induzierten Defizitmodells**

Die Auswertung der Linienübertretungen wurde für die in **Abbildung 3.40** präsentierten Versuchstiergruppen vorgenommen und diente der Beurteilung der Lokomotion nach Scopolamininjektion. **Abbildung 3.41** kennzeichnet die Anzahl der Linienübertretungen nach Vehikel- und Scopolamininjektion in trainierten versus ruhenden Kontrolltieren.

Im ersten Versuchsdurchgang (s. **Abbildung 3.41 A**) ermittelte die statistische Auswertung keine signifikanten Unterschiede bei der Anzahl der Linienübertretungen zwischen der Vehikelgruppe und den Versuchstiergruppen, die Scopolamin verabreicht bekamen ( $P > 0,05$ ; Student's t-Test). Im Testdurchgang (**B**) konnte durch die Scopolaminintervention eine Hyperlokomotion verzeichnet werden ( $P < 0,05$ ; Student's t-Test). Die trainierte Versuchsgruppe, die ebenfalls eine Scopolamininjektion verabreicht bekam, zeigte auch eine numerisch erhöhte Anzahl der Linienübertretungen, jedoch ohne Signifikanz gegenüber der Vehikelgruppe ( $P > 0,05$ ; Student's t-Test).



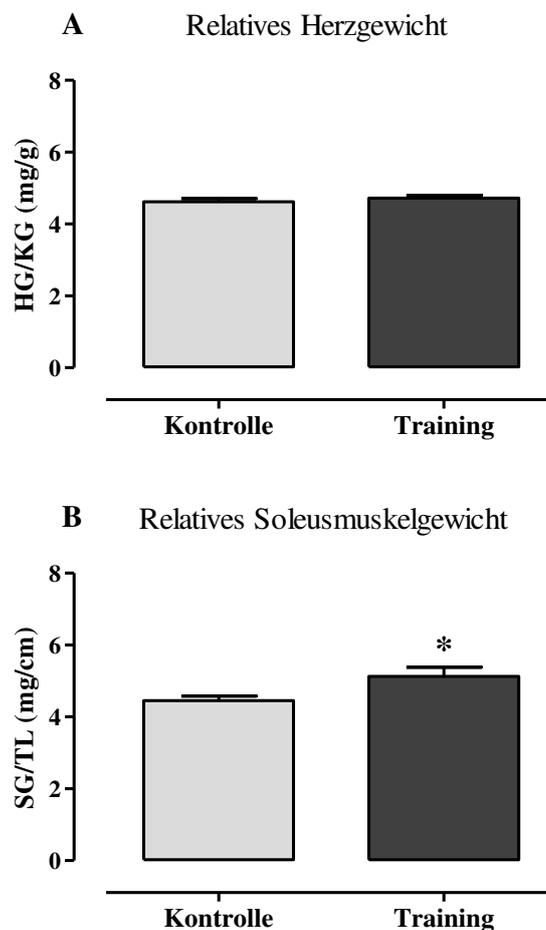
**Abbildung 3.41:** Anzahl der Linienübertretungen nach Vehikel- und Scopolamininjektion in trainierten versus ruhenden Kontrolltieren

Bezeichnungen: Kontrolle/Vehikel: Ruhende Kontrolltiere, welche eine Vehikelinjektion (0,9% NaCl-Lösung) 90 min vor Versuchsbeginn verabreicht bekamen. Kontrolle/Scop (0,5): Ruhende Kontrolltiere, welche eine intraperitoneale Scopolamininjektion in einer Dosierung von 0,5 mg/kg verabreicht bekamen. Training/Scop(0,5): Trainierte Tiere, welche nach Abschluss des Trainings zusätzlich eine intraperitoneale Scopolamininjektion in einer Dosierung von 0,5 mg/kg verabreicht bekamen. **A** 1. Versuchsdurchgang, **B** Testdurchgang. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt (n=5-6). \* signifikanter Unterschied zur Kontrolle (P<0,05)

### 3.2.5. Effekt des körperlichen Trainings in eNOS<sup>-/-</sup>-Mäusen

#### 3.2.5.1. Trainingseffizienz

eNOS<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden ebenfalls dem körperlichen Training über die Trainingsdauer von 3 Wochen unterzogen. Danach wurde die Trainingseffizienz wie zuvor beschrieben bestimmt (s. 3.2.1.). Es wurden sowohl das relative Herzgewicht, als auch das relative Soleusmuskelgewicht zur Bestimmung von Herzgröße und Muskelwachstum herangezogen.

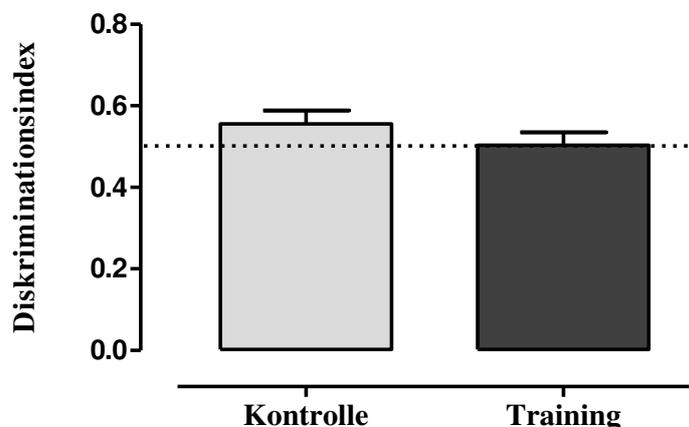


**Abbildung 3.42:** **A** Relatives Herzgewicht. Das Herzgewicht (HG) wurde auf das Körpergewicht (KG) normalisiert. Es konnte keine Trainings-induzierte Herzhypertrophie ermittelt werden. **B** Relatives Soleusmuskelgewicht. Das Soleusmuskelgewicht (SG) wurde auf die Tibiallänge (TL) bezogen. Es konnte eine Zunahme der Soleusmuskelmasse errechnet werden ( $P < 0,05$ ; Student's t-Test). Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt ( $n=6-7$ ).

Für die eNOS<sup>-/-</sup>-Mäuse konnte keine Trainings-induzierte Herzhypertrophie ermittelt werden ( $P > 0,05$ ; Student's t-Test) (s. **Abbildung 3.42 A**). Die Trainingseffizienz konnte dennoch bestätigt werden, da die periphere Muskelmasse über eine Trainings-induzierte Zunahme des relativen Soleusmuskengewichts signifikant gesteigert werden konnte ( $P < 0,05$ ; Student's t-Test) (s. **Abbildung 3.42 B**).

### 3.2.5.2. Effekt des körperlichen Trainings auf die Objektwiedererkennung in eNOS<sup>-/-</sup>-Mäusen

Zur Überprüfung der an C57BL/6-Mäusen gewonnenen Daten nach körperlichem Training wurde eNOS<sup>-/-</sup>-Mäuse ebenfalls dem körperlichen Training unterzogen und nachfolgend deren Objektgedächtnis getestet. **Abbildung 3.43** kennzeichnet den Effekt körperlichen Trainings nach einem Retentionsintervall, welches unter Kontrollbedingungen keinen Abruf einer kognitiven Leistung ermöglichte.



**Abbildung 3.43:** Graphische Darstellung der Diskriminationsfaktoren im Testdurchgang nach 10 min Verzögerungsintervall

Es konnte kein signifikanter Unterschied in den Diskriminationsfaktoren zwischen Kontroll- und Trainingsgruppe festgestellt werden ( $P > 0,05$ ; Student's t-Test). Es konnte kein signifikanter Unterschied, weder der Kontrollgruppe noch der Trainingsgruppe, zu 0,5 festgestellt werden ( $P > 0,5$ ; One-sample t-Test). Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt ( $n=8$ ). Die gestrichelte Linie kennzeichnet den Testwert 0,5.

Auch die eNOS<sup>-/-</sup>-Mäuse demonstrierten nach körperlichem Training keinen signifikanten Unterschied, weder zur ruhenden Kontrollgruppe ( $P > 0,05$ ; Student's t-Test) noch zum Testwert 0,5 ( $P > 0,05$ ; One-sample t-Test). Diese Daten bestätigten den fehlenden Einfluss des körperlichen Trainings auf die Objektwiedererkennung in Mäusen.

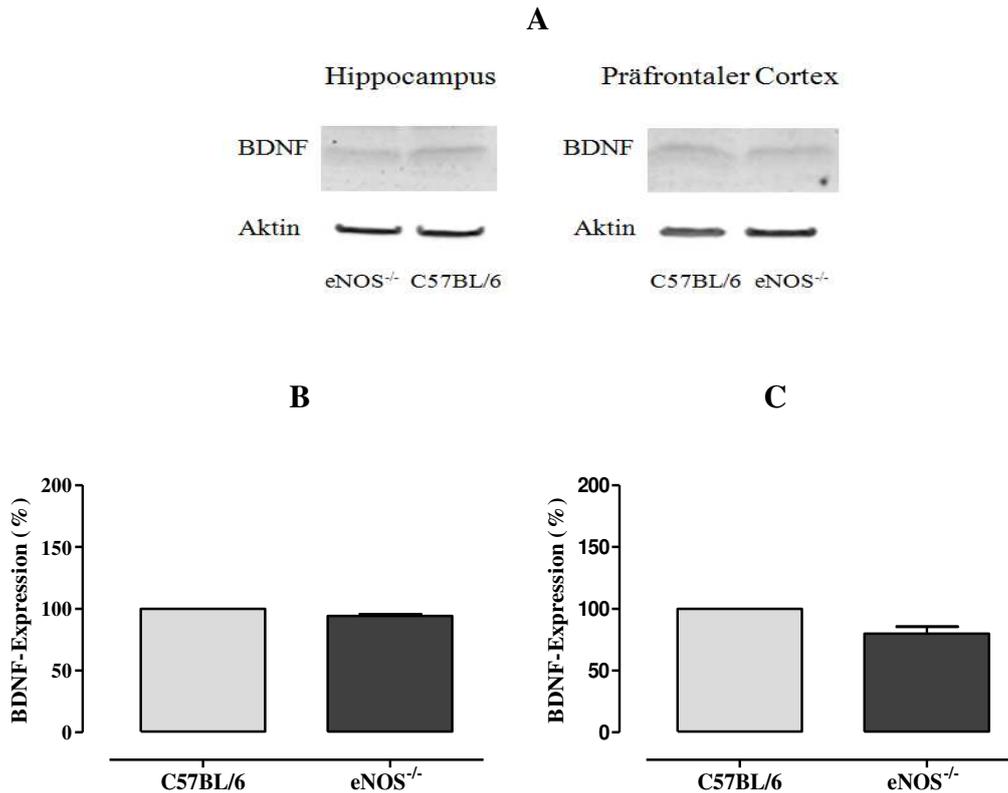
### **3.3. Effekte von endogenem NO**

In den vorangegangenen Untersuchungen konnte kein Einfluss von körperlichem Training auf die Proteinexpression der eNOS und des BDNF im Gehirn gezeigt werden. Dies lässt den Schluss zu, dass weder eNOS noch BDNF durch Trainings-induzierte Vorgänge im Gehirn reguliert werden. Jedoch gibt es Hinweise dafür, dass die Regulation des BDNF durch VEGF gesteuert wird (Carmeliet, 2003) und VEGF die eNOS-Phosphorylierung steigert (Mount et al., 2007). Insofern wäre eine koordinative Interaktion zwischen NO und BDNF möglich. Daher wurde die Fragestellung untersucht, ob endogenes NO die BDNF-Expression reguliert und einen Einfluss auf die kognitive Leistung besitzt.

#### **3.3.1. Effekt von endotheliale NO auf die BDNF-Expression**

Die Regulation des BDNF durch endogenes NO wurde mithilfe der eNOS<sup>-/-</sup>-Knockout-Linie eruiert, welche keine endothelständige NOS exprimiert. Zur Untersuchung der basalen BDNF-Regulation wurde die Proteinexpression in C57BL/6-Mäusen und eNOS<sup>-/-</sup>-Tieren bestimmt. **Abbildung 3.44** kennzeichnet die BDNF-Expression der verschiedenen Tierlinien im Gehirn.

Die statistische Auswertung ermittelte keinen signifikanten Unterschied der BDNF-Expression in C57BL/6- und eNOS<sup>-/-</sup>-Mäusen ( $P > 0,05$ ; Student's t-Test). Aus diesem Grund muss vermutet werden, dass endotheliales NO keinen regulatorischen Effekt auf die Expression des BDNF ausübt, weder im Hippocampus noch im präfrontalen Cortex.



**Abbildung 3.44:** Quantitative Evaluierung der BDNF-Expression im Hippocampus und im präfrontalen Cortex

**A** Repräsentative Western-Blots der BDNF-Expression im Gehirn, welche auf Aktin normalisiert wurden. **B, C** Es konnte keine signifikant veränderte Expression des BDNF in den eNOS<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen ermittelt werden, weder im Hippocampus (**B**), noch im präfrontalen Cortex (**C**). Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt (n=3). (Kontrolle=100%; die Säule ist repräsentativ für alle Kontrollen).

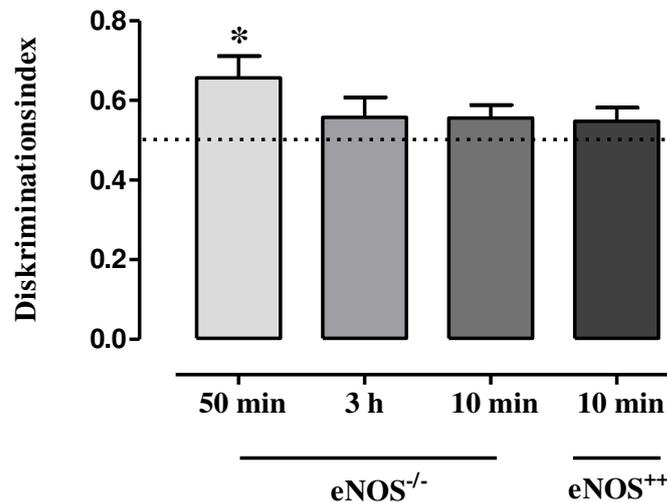
### 3.3.2. Effekt von endotheliale NO auf die Objektwiedererkennung

In der folgenden Untersuchung wurde der Fragestellung nachgegangen, ob eine Veränderung der NO-Bioverfügbarkeit einen Einfluss auf die Objektwiedererkennung in Mäusen besitzt. Aus diesem Grunde wurden transgene Tierlinien mit einer verringerten NO-Bioverfügbarkeit (eNOS<sup>-/-</sup>-Mäuse) oder einer erhöhten basalen NO-Produktion (eNOS<sup>+/+</sup>-Mäuse) in der Objekterkennung auf ihre kognitiven Leistungen getestet.

Da C57BL/6-Mäuse nach einem Retentionsintervall von 50 min zu einer reproduzierbaren Wiedererkennung von Objekten fähig waren, wurde zunächst untersucht, ob Knockout-Tiere, welche keine endothelständige NOS mehr exprimierten, eine verschlechterte Kognition nach Anwendung des 50minütigen Intervalls aufwiesen (s. **Abbildung 3.45**). Vertreter beider transgenen Linien (eNOS<sup>-/-</sup>-, eNOS<sup>+/+</sup>-Tiere) wurden ebenfalls nach

Retentionsintervallen getestet, welche in C57BL/6-Mäusen zu einem Verlust der Diskriminationsleistung führten (3 h, 10 min).

**Abbildung 3.45** illustriert die graphische Auswertung der ermittelten Diskriminationsfaktoren.



**Abbildung 3.45:** Graphische Darstellung der Diskriminationsfaktoren im Testdurchgang nach 50 min, 10 min und 3 h in eNOS<sup>-/-</sup>-Mäusen und nach 10 min in eNOS<sup>++</sup>-Tieren. Nur für das 50 min Intervall konnte in den eNOS<sup>-/-</sup>-Tieren ein signifikanter Unterschied zu 0,5 festgestellt werden ( $P < 0,05$ ; One-sample t-Test). Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt ( $n=6-8$ ). Die gestrichelte Linie kennzeichnet den Testwert 0,5.

In **Abbildung 3.45** wird erkennbar, dass nach 50 min ebenfalls eine Diskriminationsleistung der eNOS<sup>-/-</sup>-Mäuse abgerufen wurde, welche bei Verlängerung (3 h) oder sehr starker Verkürzung des Intervalls (10 min) verloren ging. Die statistische Auswertung ermittelte nur für den Diskriminationsfaktor nach 50 min einen signifikanten Unterschied versus dem Testwert 0,5 ( $P < 0,05$ ; One-sample t-Test). Die Knockout-Tiere zeigen demnach keine Veränderung im Kognitionsmuster im Vergleich zu den Kontrolltieren mit endothelständiger NOS (C57BL/6). Ähnliches gilt für die eNOS-überexprimierende Maus (eNOS<sup>++</sup>). Ein Verzögerungsintervall von 10 min ließ kein verändertes Verhalten in der Objektwiedererkennung sichtbar werden. Der statistische Vergleich zu 0,5 fiel nicht signifikant aus ( $P > 0,05$ ; One-sample t-Test).

Es lässt sich auf Basis dieser Befunde vermuten, dass weder das Fehlen noch die Überexpression der eNOS einen Einfluss auf die kognitive Funktion Objektwiedererkennung besitzt.

## 4. Diskussion

Das Ziel dieser Dissertationsarbeit lag in der Beurteilung pharmakologischer und nicht-pharmakologischer Interventionen zur Behandlung von dementiellen Erkrankungen. Im Zuge dieser Untersuchungen wurden nachfolgend die molekularen und kognitiven Effekte des cholinergen Liganden Vareniclin sowie von körperlichem Training bewertet.

Es gilt als wissenschaftlich gesichert, dass cholinerge Mechanismen an kognitiven Prozessen, die das Lernen und Gedächtnis betreffen, beteiligt sind (s. 1.1.). Dabei kommt der cholinergen Signaltransduktion via nikotinischer Acetylcholinrezeptoren des Subtyps  $\alpha_4\beta_2$  eine Schlüsselrolle zu. In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen mit Vareniclin *in vivo* an C57BL/6-Mäusen und *in vitro* an neuronalen und endothelialen Zellen durchgeführt, die der Evaluation des regulatorischen Einflusses der Testsubstanz auf den  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR dienten. Die Beurteilung des kognitiven Effekts erfolgte anhand zweier unterschiedlicher Modelle zur Erfassung der Objektwiedererkennung. Die Applikation des Partialagonisten induzierte keine *per se* verbesserte Leistung von C57BL/6-Mäusen in Aufgabenstellungen der Objektwiedererkennung und des räumlichen Objektgedächtnisses. Hingegen bewirkte die Testsubstanz bei Anwendung eines mit kognitiven Dysfunktionen einhergehenden pharmakologischen Defizitmodells eine Normalisierung der Objekterkennung auf Kontrollebene. Die partielle Aufhebung des anticholinerg induzierten kognitiven Defizits war von einer Vareniclin-induzierten Hochregulation der Untereinheiten des  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR begleitet, welche posttranskriptionell gesteuert war.

Da kardiovaskuläre Risikofaktoren als bedeutsame Faktoren für die Entstehung von Demenzerkrankungen definiert wurden und körperliches Training als die stärkste vasoprotektive, nicht-pharmakologische Intervention angesehen wird, wurden C57BL/6-Mäuse und eNOS<sup>-/-</sup>-Mäuse einem erzwungenen Trainingsprotokoll zugeführt. Im Anschluss an die letzte Trainingseinheit erfolgte die Beurteilung der trainierten Tiere in der Objekterkennung sowie die Evaluation der Proteinexpression – eNOS,  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR, BDNF – in den für kognitive Prozesse bedeutsamen Gehirnstrukturen. Im Wesentlichen veranschaulichten die gewonnenen Ergebnisse keine Veränderungen der Proteinexpression im präfrontalen Cortex und Hippocampus infolge körperlicher Aktivität. Das Ausbleiben zentraler adaptiver Proteinregulationen war von einem fehlenden Trainings-induzierten Effekt auf die Objekterkennung begleitet.

## 4.1. Effekte von Vareniclin

### 4.1.1. Effekt von Vareniclin auf die nAChR-Regulation *in vivo*

Rezeptoradaptationen wurden für eine Vielzahl von Rezeptoren beschrieben, beispielsweise für Dopaminrezeptoren (Creese & Sibley, 1981), T<sub>3</sub> (Triiodthyronin)-Rezeptoren (Samuels & Tsai, 1973), mAChR (Schiller, 1979; Uchida et al., 1979; Ehlert et al., 1980) und nAChR (Wonnacott, 1990) infolge der Besetzung durch Liganden. Klassischerweise bewirkt die Aktivierung des Rezeptors einen kompensatorischen „Knock-down“ desselben, die antagonistische Besetzung des Rezeptors hingegen induziert eine Hochregulation (Wonnacott, 1990). Der am längsten bekannte Effekt von chronischer Nikotinexposition ist die „paradoxe Hochregulation“ (Wonnacott, 1990) von nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (Xiao et al., 2009). Diese Nikotin-induzierte Hochregulation ist subtypselektiv und demonstriert keine oder eine nur gering ausgeprägte Hochregulation von  $\alpha_7$ -Rezeptoren (Marks et al., 1986; Collins et al., 1994),  $\alpha_3/\alpha_6\beta_2^*$  (Nguyen et al., 2003; McCallum et al., 2006) oder  $\alpha_3\beta_4^*$ -Rezeptoren (Nguyen et al., 2003; Xiao et al., 2009).  $\alpha_4\beta_2^*$ -nAChR hingegen erfuhren eine robuste Hochregulation in selektiven Gehirnarealen infolge Nikotinexposition (Marks et al., 1992; Flores et al., 1997; Perry et al., 1999; Nguyen et al., 2004). Unter anderem wurde eine selektive Hochregulation von  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR in Cortex, Hippocampus, Striatum, Mittelhirn und Hypothalamus beschrieben (Xiao et al., 2009). Ebenso wie Nikotin führte die Applikation weiterer Liganden an nAChR, beispielsweise Cytisin (Schwartz & Kellar, 1985), Anatoxin (Rowell & Wonnacott, 1990) oder des Antagonisten Mecamylamin (Pauly et al., 1996), zu einer Hochregulation von nAChR *in vivo*. Dieser Befund ließ den Schluss zu, dass eine Rezeptorbesetzung – nicht seine Aktivierung – zur Regulation von nAChR ausreicht (Gopalakrishnan et al., 1997).

Da Vareniclin eine ausgesprägte Affinität zu  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR ( $K_i=0,1$  nM) aufweist (Rollema et al., 2007a), wurde der Partialagonist hinsichtlich seiner regulierenden Eigenschaften auf nAChR an C57BL/6-Mäusen getestet. Die Substanz wurde über den Zeitraum von 14 Tagen über das Trinkwasser appliziert und nachfolgend wurde die Expressionsdichte in den für kognitive Prozesse wichtigen Gehirnarealen – Neocortex, Hippocampus – bestimmt. Eine ausreichende Substanzaufnahme wurde über die Messung der täglichen Trinkwassermenge bestimmt (s. **Abbildung 3.1**). Dass Vareniclin eine ausreichende Hirnpenetration zur Regulation zentraler nAChR aufwies, wurde in vorangegangenen Studien demonstriert (Husmann et al., 2012). Die chronische Applikation von Vareniclin

fürte in einer Dosierung von 3 mg/kg zu einer dosisabhängigen Erhöhung der Expression von Untereinheiten des  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR im Neocortex (s. **Abbildung 3.2**). Dieser Befund stand im Einklang mit dem Studienergebnis von Turner et al., welche Vareniclin via osmotischer Minipumpen über 14 Tage in C57BL/6-Mäusen infundierten und eine signifikante Hochregulation in verschiedenen Gehirnarealen, unter anderem im Cortex, bei einer Konzentration von 1,8 mg/kg demonstrierten (Turner et al., 2011). Eine jüngst erschienene Studie von Hussmann et al. (2012) bestätigte den Befund der Vareniclin-induzierten Hochregulation von nAChR im cerebralen Cortex von C57BL/6-Mäusen (Hussmann et al., 2012). Bei Vergleich dieser Studienbefunde ist zu beachten, dass der in den zitierten Studien eingesetzte Radioligand [ $^3$ H]Epibatidin Bindungsaffinität zu allen membranständigen heterologen Subtypen von nAChR aufweist – hingegen erlaubte die in unserer Untersuchung gewählte Western-Blot-Methode die gezielte Erfassung von  $\alpha_4$ - und  $\beta_2$ -Untereinheiten des nAChR über die gesamte Zelle. Ein unterschiedliches Expressionsmuster wurde infolge oraler Vareniclinverabreichung im hippocampalen Gewebe ermittelt. Die Expressionsdichte im Hippocampus war bereits nach einer Vareniclinapplikation von 1 mg/kg in beiden Untereinheiten signifikant erhöht (s. **Abbildung 3.3**). Turner et al. demonstrierten infolge Vareniclinexposition ebenfalls eine Hochregulation heterologer nAChR im Hippocampus bei einer Konzentration von 1,8 mg/kg/d (Turner et al., 2011). Da hippocampale nAChR bei einer geringeren Konzentration angesprochen wurden als corticale nAChR, ließ dies den Schluss zu, dass diese Gehirnregion einen wesentlichen Schauplatz Vareniclin-induzierter Effekte darstellte. Dabei fiel auf, dass eine selektive Hochregulation der hippocampalen  $\beta_2$ -Untereinheit - nicht jedoch der  $\alpha_4$ -Untereinheit - bereits bei einer Konzentration von 0,1 mg/kg/d beobachtet wurde. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre das vermehrte Vorliegen monomerer, unaggregierter  $\alpha_4$ - im Vergleich zu  $\beta_2$ -Untereinheiten, die einer Degradation im Zytosol unterliegen (Christianson & Green, 2004) – so erklärten Hussmann et al. das beobachtete Ausbleiben der  $\alpha_4$ -Hochregulation infolge Nikotinexposition (Hussmann et al., 2011). Unter der Voraussetzung, dass die Versuchstiere eine konstante Menge an Vareniclin über das Trinkwasser aufnahmen, war die orale Verabreichung der Substanz über zwei Wochen durch gleichmäßige Plasmaspiegel gekennzeichnet. Zur Bestätigung der aus dem oralen Fütterungsprotokoll gewonnenen Daten wurden C57BL/6-Mäuse ebenfalls intraperitonealen Injektionen unterzogen. Der Einsatz von Bolus-Injektionen war durch hohe Maximalkonzentrationen der Substanz im Gehirn charakterisiert. Die Applikation

von Vareniclin (3 mg/kg; i.p.) führte zu einer signifikanten Hochregulation beider Untereinheiten des nAChR im Neocortex (s. **Abbildung 3.7**). Obgleich die  $\alpha_4$ -Untereinheit im Hippocampus nicht signifikant erhöht war (s. **Abbildung 3.8**), illustrierte die Borderline-Signifikanz (P-Wert: 0,055) eine Tendenz zur Hochregulation. Aus diesem Grund ließ sich postulieren, dass unter Anwendung beider Applikationsmodelle – oral versus intraperitoneal – Vareniclin eine effiziente Hochregulation der Untereinheiten des nAChR induzierte. Dabei fiel auf, dass sowohl hippocampale als auch corticale nAChR eine regulatorische Beeinflussung durch den Partialagonisten *in vivo* demonstrierten - diese Effekte lagen jedoch offenbar keiner verstärkten Transkriptionsrate von Untereinheiten zugrunde. Weder oral noch intraperitoneal verabreichtes Vareniclin konnte in den untersuchten Gehirnregionen eine erhöhte mRNA-Expression der Untereinheiten des nAChR induzieren (s. **Abbildung 3.5**, **Abbildung 3.6**, **Abbildung 3.9**, **Abbildung 3.10**). Für Nikotin war bereits bekannt, dass diese Substanz hochregulierende Effekte über posttranslationale Mechanismen ausübte (Govind et al., 2009). Diese Beobachtung beruhte auf der Entdeckung, dass die mRNA-Expression der  $\alpha_2$ -,  $\alpha_3$ -,  $\alpha_4$ -,  $\alpha_5$ - und  $\beta_2$ -Untereinheiten infolge Nikotinexposition *in vivo* nicht erhöht war (Marks et al., 1992). Auch der Antagonist Mecamylamin illustrierte eine verstärkte [<sup>3</sup>H]Nikotin-Bindung in Mäusen, ohne die mRNA-Expression von nAChR-Untereinheiten zu verändern (Pauly et al., 1996). Diese Befunde ließen den Schluss zu, dass Vareniclin, in einer Reihe mit Nikotin und Mecamylamin, keine Induktion der *de novo* Proteinbiosynthese *in vivo* bewirkte – offenbar liegen der beobachteten Vareniclin-induzierten Hochregulation von nAChR posttranskriptionelle Adaptationen zugrunde, beispielsweise eine veränderte Degradationsrate.

nAChR wurden ebenfalls auf Endothelzellen (Macklin et al., 1998) und glatten Muskelzellen (Shanker et al., 2006) nachgewiesen. Da vaskuläre nAChR als Ligand-gesteuerte Ionenkanäle funktionieren (Macklin et al., 1998) und das Gehirn einer ausgezeichneten Durchblutung unterliegt, stellte sich die Frage, ob die beobachtete Hochregulation als Folge einer neuronalen oder vaskulären nAChR-Regulation auftrat. Die Aorta wurde als Modell zur Evaluation des Beitrags Vareniclin-induzierter vaskulärer Effekte gewählt. Das Leitungsgefäß demonstrierte keine Hochregulation beider Untereinheiten des nAChR nach Vareniclinexposition (s. **Abbildung 3.4**). Auf Basis dieses Befundes ließe sich postulieren, dass vaskuläre nAChR keiner Regulation durch Stimulation unterliegen und neuronale nAChR hochreguliert werden. Diese Aussage ist

jedoch unter dem möglichen Kritikpunkt zu betrachten, dass *in vivo* bereits gezeigt wurde, dass Vareniclin einer Aufkonzentrierung im Gehirn unterliegt, die Serumspiegel überschreitet. Die Substanz zeigte nach 14 Tagen Vareniclinexposition via osmotischer Minipumpen eine 1,5fach höhere Konzentration im Rattengehirn (0,66  $\mu\text{M}$ ) als im Blutserum (0,45  $\mu\text{M}$ ) (Hussmann et al., 2012). Die zweifach tägliche subkutane Injektion über 10 Tage erbrachte hingegen sogar eine 2,8fache verstärkte Anreicherung von Vareniclin im Gehirn (4,2  $\mu\text{M}$ ) im Vergleich zum Serum (1,5  $\mu\text{M}$ ) (Hussmann et al., 2012). Daher wäre es möglich, dass die in der Peripherie vorliegende Konzentration zur Hochregulation von nAChR nicht ausreichend effizient war.

Vaskuläre nAChR modulieren angiogenetische Prozesse, einschließlich Überleben, Proliferation und Migration von Endothelzellen (Cooke & Ghebremariam, 2008). Deren Aktivierung durch Acetylcholin oder Nikotin induziert physiologische oder pathologisch entartete angiogenetische Mechanismen (Cooke & Ghebremariam, 2008). Die Heterogenität der Ansprechbarkeit mikro- und makrovaskulärer Gefäßtypen auf angiogenetische Faktoren wurde bereits in vorangegangenen Untersuchungen studiert (Bastaki et al., 1997). Es gilt als wissenschaftlich gesichert, dass neue Blutgefäße in erster Linie aus der Mikrovaskulatur entspringen (Bastaki et al., 1997). Da die Aorta ein makrovaskuläres Gefäß präsentiert und das Gehirn viele mikrovaskuläre Gefäße beinhaltet, sind unterschiedliche Effekte beider Gefäßtypen infolge Vareniclinstimulation nicht unwahrscheinlich. Aus diesem Grund sollten Untersuchungen an mikrovaskulären Endothelzellen *in vivo* Gegenstand weiterer Untersuchungen darstellen. Mikrovaskuläre cerebrale Endothelzellen (bEnd.3 Zellen) werden hinsichtlich ihrer Ansprechbarkeit auf Vareniclin im nachfolgenden Kapitel (s. **4.1.2.**) *in vitro* diskutiert.

### **4.1.2. Effekt von Vareniclin auf die nAChR-Regulation *in vitro***

Da das Gehirn viele heterogene Populationen von Zelltypen beinhaltet (Morimoto & Koshland, Jr., 1990) und nAChR auf einer Vielzahl von Zelltypen nachgewiesen wurden (Kumar & Meizel, 2005; Shanker et al., 2006; Arredondo et al., 2008; Cooke & Ghebremariam, 2008), erlaubten Studien des Gehirns keine Differenzierung beteiligter Zelltypen an der Vareniclin-induzierten Regulation von AchR. Die Etablierung einer *in vitro* Zelllinie diene der Charakterisierung des neuronalen Beitrags in zugrunde liegenden cholinergen Mechanismen für die beobachtete Hochregulation *in vivo*. HT-22 Zellen

präsentieren eine Zelllinie, die aus dem murinen Hippocampus gewonnen und mithilfe des Simian virus-40 T-Antigen immortalisiert wurde (Bagamasbad et al., 2012). Diese Zellen veranschaulichten in vorangegangenen Studien Eigenschaften differenzierter Neurone (Sagara et al., 1998) sowie funktionale cholinerge Fähigkeiten, beispielsweise die Expression cholinergischer Marker wie der Cholinacetyltransferase und muskarinischer AchR und eine gesteigerte [<sup>3</sup>H]ACh-Freisetzung infolge Depolarisation (Liu et al., 2009). Da der Hippocampus eine Schlüsselrolle einnimmt in Prozessen, die das Gedächtnis betreffen (Wang & Morris, 2010) und die hippocampale cholinerge Hypofunktion zu den kognitiven Defiziten bei *Morbus Alzheimer* beiträgt (Schliebs & Arendt, 2006; Liu et al., 2009), wurden HT-22 Zellen hinsichtlich ihres Expressionsmusters von nAChR und deren Regulation durch Vareniclin studiert.

Die Bestimmung der basalen Expressionsdichte der Untereinheiten des  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR in HT-22 Zellen demonstrierte eine signifikant verstärkte Expression der  $\beta_2$ -Untereinheit im Vergleich zur  $\alpha_4$ -Untereinheit (s. **Abbildung 3.11**). Dabei erfuhren beide Untereinheiten des  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR nach 48 h, nicht jedoch nach 24 h, eine signifikante Hochregulation infolge der Exposition mit Vareniclin (s. **Abbildung 3.12**). Eine mögliche Erklärung für die induzierte Hochregulation ist die  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR-Aktivierung (Govind et al., 2009). Da nAChR im Allgemeinen einer profunden und langanhaltenden Desensibilisierung infolge der Exposition mit Agonisten unterliegen, die eine funktionale Blockade bewirkt (Wonnacott, 1990) und Antagonisten ohne Aktivierung des nAChR ebenfalls eine Hochregulation induzieren (Peng et al., 1994; Gopalakrishnan et al., 1996; Gopalakrishnan et al., 1997; Hussmann et al., 2011), ist die Desensibilisierung des nAChR durch Vareniclin als mögliche Ursache der beobachteten Hochregulation wahrscheinlicher. Es bestehen Hinweise darauf, dass die Agonist-induzierte Hochregulation von  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR durch deren Desensibilisierung initiiert wird (Marks et al., 1983; Schwartz & Kellar, 1985; Fenster et al., 1999). Dies wird auch durch die Tatsache bekräftigt, dass über den Vollagonisten Nikotin berichtet wurde, dass er bis zu 45fach potenter in der Desensibilisierung als in der Aktivierung von nAChR *in vitro* agiert (Hussmann et al., 2012). Da für Agonisten und Antagonisten maximale *steady state* Effekte auf die nAChR-Radioligandbindung und Erhöhung der Anzahl von  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR innerhalb von 8 h (HEK293 Zellen) erreicht wurden (Gopalakrishnan et al., 1997), erscheint die Detektion hochregulierter nAChR erst 48 h nach Vareniclinexposition in HT-22 Zellen verspätet. Eine unterschiedliche Phosphorylierungsrate in den verschiedenen Zelltypen, die die Desensibilisierung von

Rezeptoren zu deren Liganden reguliert (Huganir & Greengard, 1990), könnte diese Diskrepanz erklären, sowie ein abweichender Wirkmechanismus zwischen den Liganden unter Berücksichtigung der unterschiedlichen eingesetzten Zelllinien und Methodiken. Beispielsweise detektierten Hussmann et al. eine Carbachol-induzierte Hochregulation von  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR bereits nach 6 h Stimulation in HEK Zellen, im Unterschied zu einer 12stündigen Inkubationszeit für Nikotin und Cholin. Die Autoren bewiesen für Carbachol einen zusätzlichen Wirkmechanismus über die Stimulation muskarinischer AchR, welche die Expression von nAChR induziert (Hussmann et al., 2011). Bislang existieren keine kinetischen Untersuchungen zur Evaluation der regulatorischen Wirkung weiterer Agonisten und Antagonisten an HT-22 Zellen, die einen direkten Vergleich zu Vareniclin an dieser Zelllinie erlauben. Diese sollten Gegenstand zukünftiger Studien darstellen.

Eine Hochregulation radioaktiver nAChR-Bindungsstellen ist von vielen Autoren *in vitro* beschrieben worden, beispielsweise für die Agonisten Nikotin (Peng et al., 1994; Gopalakrishnan et al., 1997; Davila-Garcia et al., 1999; Xiao & Kellar, 2004; Sallette et al., 2005; Hussmann et al., 2011; Hussmann et al., 2012), Cholin (Gahring et al., 2010), oder Carbachol (Xiao & Kellar, 2004; Hussmann et al., 2011). Die  $\alpha_4\beta_2$ -AChR-Partialagonisten Sazetidin-A (Hussmann et al., 2012), Cytisin (Gopalakrishnan et al., 1997) und Vareniclin (Hussmann et al., 2012) sowie nAChR-Antagonisten, beispielsweise Dihydro- $\beta$ -Erythroidin (Gopalakrishnan et al., 1996; Gopalakrishnan et al., 1997; Hussmann et al., 2011) oder Mecamylamin (Peng et al., 1994) demonstrierten ebenfalls eine Erhöhung der Bindungsneigung radioaktiver Liganden *in vitro*. Diese Befunde ließen den Schluss zu, dass die Hochregulation des nAChR nur der Ligandbindung und keiner Aktivierung des Ionenkanals bedarf. Durch die Anwendung subtypeselektiver Radioliganden, beispielsweise [ $^3$ H]Cytisin (Gopalakrishnan et al., 1996; Gopalakrishnan et al., 1997) und [ $^3$ H]Epibatidin an  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR transfizierten Zelllinien (Xiao & Kellar, 2004; Gahring et al., 2010) oder von [ $^3$ H]Nikotin an immunoisolierten  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR (Peng et al., 1994) konnte eine spezifische Hochregulation des  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR infolge seiner Besetzung nachgewiesen werden. Dabei wurde in einem Großteil der Studien der Anstieg der Radioligandbindung als Folge einer erhöhten Dichte, nicht der Affinität zu nAChR interpretiert (Peng et al., 1994; Govind et al., 2009). Hussmann et al. korrelierten die erhöhte Expression der  $\alpha_4$ - und  $\beta_2$ -Untereinheiten des nAChR – detektiert via Western-Blot - mit der gesteigerten [ $^3$ H]Epibatidinbindung infolge Carbacholstimulation (Hussmann et al., 2011). Daher war es möglich – unter Berücksichtigung, dass direkte Vergleichsstudien

ausstehen – die in unserer Studie anhand Western-Blot gemessene verstärkte Expression von Untereinheiten des  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR mit Bindungsexperimenten aus der Literatur zu vergleichen.

Der in **Abbildung 3.13** dargestellte Effekt stand im Einklang mit dem Studienbefund von Hussmann et al., welche eine primäre corticale Neuronenkultur über 10 Tage mit Vareniclin (1  $\mu$ M) stimulierten und eine 2,5-3fache Erhöhung der [ $^{125}$ I]Epibatidinbindung detektierten (Hussmann et al., 2012). Die Autoren assoziierten diesen Bindungsanstieg mit einer Hochregulation von  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR infolge der Stimulation mit Vareniclin. Die deutlich erhöhte Regulation von  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR im Vergleich zu unserer Studie (150-170%) bei gleicher Vareniclinkonzentration (1  $\mu$ M) war mögliche Folge der unterschiedlichen Inkubationszeit – 48 h versus 240 h – oder fand ihre Ursache in der unterschiedlichen Detektionsmethode. Bei Vergleich beider Studien war ebenfalls zu bedenken, dass Hussmann et al. infolge der Durchführung von Bindungsexperimenten an Membranpräparationen nur eine Subpopulation von heterologen nAChR erfassten. Unsere Studie hingegen erlaubte die Detektion spezifischer  $\alpha_4$ - und  $\beta_2$ -nAChR-Untereinheiten im Zellhomogenat und demonstrierte einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Rezeptorexpression (s. **Abbildung 3.13**). Die divergierende Methode und die Erfassung unterschiedlicher Pools von nAChR limitierte die Vergleichbarkeit beider Studien. Aus diesem Grund wurden konzentrationsabhängige Effekte von Vareniclin auf die Untereinheiten des  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR ebenfalls auf membranärer Ebene bestimmt (s. **Abbildung 3.14**). Der ähnliche Anstieg der nAChR-Expression in Homogenaten und Membranpräparationen infolge Vareniclinexposition ließ den Schluss zu, dass zytosolische Untereinheiten – ein beachtlicher Fundus von intrazellulären nAChR war verantwortlich für zwei Drittel der Antikörperbindung in Neuronen (Stollberg & Berg, 1987) - keinen Beitrag zu der beobachteten Hochregulation leisteten. Ein fehlender regulatorischer Einfluss auf zytosolische Kompartimente wurde ebenfalls für die Nikotin-induzierte Hochregulation postuliert (Gopalakrishnan et al., 1997). Zytosolische Fraktionen wurden ebenfalls auf ihre nAChR-Expression infolge Vareniclinexposition getestet (s. **Abbildung 3.15**) und es konnte bestätigt werden, dass intrazelluläre Untereinheiten keiner Regulation durch Vareniclin unterliegen. Dieser Befund war jedoch unter dem möglichen Vorbehalt zu betrachten, dass eine Sedimentation mit der Zellmembran von intrazellulären Rezeptoren, die in membranumhüllten Vesikeln und membranären Kompartimenten des Endoplasmatischen Retikulums vorliegen, nicht ausgeschlossen ist (Gopalakrishnan et al.,

1997). Diese Untereinheiten würden dann mit der Membranpräparation detektiert werden und sich nicht in zytosolischen Fraktionen anreichern. Auf Basis dieser Annahme wäre eine intrazelluläre Wirkung von Vareniclin auf diese angesprochenen Rezeptoren ebenfalls möglich, obgleich die gewählte Zentrifugationsgeschwindigkeit von 20000×g und das basal hohe Expressionsniveau der Untereinheiten in den zytosolischen Fraktionen nicht für deren Sedimentation mit der Zellmembran sprechen.

Aufgrund der ähnlichen quantitativen Faktoren in den Gesamtextrakten und membranären Fraktionen ließ sich zu der Hypothese, dass Vareniclin membranäre nAChR regulierte, postulieren, dass Vareniclin extrazelluläre Effekte über seine Interaktion mit membranständigen  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR ausübte. Aufgrund seiner geringen Molekülgröße und organischen Struktur war eine Membranpermeabilität und Diffusion innerhalb die Zelle von Vareniclin grundsätzlich denkbar, wie sie ebenfalls für die tertiären Amine Nikotin und den Partialagonisten Cytisin – die Muttersubstanz von Vareniclin (Coe et al., 2005) – beschrieben worden sind (Peng et al., 1994). Dieser über die Zelloberfläche vermittelte, postulierte Wirkmechanismus von Vareniclin war im Einklang mit der beobachteten Hochregulation durch andere nAChR-Liganden, beispielsweise das quarternäre Amin Carbamylcholin oder Carbachol, welche membranimpermeabel sind und für die eine extrazelluläre Wirkung über membranständige Rezeptoren bereits postuliert wurde (Peng et al., 1994; Xiao & Kellar, 2004).

Es fiel auf, dass, obgleich die Hochregulation beider Untereinheiten in der gesamten Zelle und der Membran eine ähnliche Ausprägung erfuhr, keine Signifikanz der membranären  $\alpha_4$ -Untereinheit bei Stimulation mit 1  $\mu$ M Vareniclin demonstriert werden konnte. Eine selektive Regulation der  $\beta_2$ -Untereinheit wurde ebenfalls durch die nAChR-Liganden Nikotin (Hussmann et al., 2011) und Cholin (Gahring et al., 2010) via Western-Blot-Methode detektiert. Eine mögliche Ursache hierfür wäre der Befund, dass in der Membran ein stöchiometrisches Verhältnis von funktionellen  $(\alpha_4)_2(\beta_2)_3$ -Rezeptoren vorherrscht. Anand et al. injizierten *Xenopus laevis* Oocyten  $\alpha_4$ - und  $\beta_2$ -cRNA (1:1) und postulierten durch Messung methionylierter Reste und Kalkulation über die molekularen Gewichte die Existenz von Pentameren im Verhältnis 2:3 (Anand et al., 1991). Diese Pentamere veranschaulichten eine Bindungsneigung zu Nikotin und gleiche Molekülgrößen wie extrahierte nAChR aus dem Gehirn (Anand et al., 1991). Auf unsere Untersuchung angewandt würde dieser Befund bedeuten, dass die Vareniclinexposition die  $\beta_2$ -Expression verstärkt hochregulierte aufgrund des stärkeren membranären Vorkommens derselben im

Vergleich zur  $\alpha_4$ -Untereinheit. Untermauert werden konnte diese Behauptung durch die Bestimmung der basalen Expressionsniveaus beider Untereinheiten. In der Tat illustrierten sowohl Messungen der mRNA- (s. **Abbildung 3.16**) als auch der Proteinexpression (s. **Abbildung 3.11**) eine signifikant höhere Dichte von  $\beta_2$ - im Vergleich zu  $\alpha_4$ -Untereinheiten.

Generell stellt sich nun die Frage, welche Mechanismen der beobachteten Vareniclin-induzierten Hochregulation zugrunde liegen könnten. Da Vareniclin keine Effekte auf die Expression von  $\alpha_4$ - und  $\beta_2$ -Transkripten ausübte (s. **Abbildung 3.17**), ließ sich die Induktion der *de novo* Proteinbiosynthese der Untereinheiten des Rezeptors infolge seiner Ligandbindung ausschließen. Dieser Befund wurde in zahlreichen Studien mit dem Vollagonisten Nikotin in ähnlicher Weise beobachtet (Peng et al., 1994; Bencherif et al., 1995). Dieses Ergebnis implizierte einen posttranskriptionellen Mechanismus, beispielsweise eine veränderte Translationsrate von  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR, wie er für die Nikotin-induzierte Hochregulation bereits beschrieben wurde (Gopalakrishnan et al., 1997) oder eine erniedrigte Degradationsrate dieser Rezeptoren. Es waren Peng et al., welche M10 Zellen mit Dexamethason und Cycloheximid stimulierten und beobachteten, dass in den Zellen, welche zusätzlich mit Nikotin inkubiert wurden, eine erhöhte Rezeptorexpression gemessen werden konnte (Peng et al., 1994). Die Autoren postulierten einen verringerten Rezeptorkatabolismus von oberflächlichen  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR aufgrund potenzieller Konformationsänderungen in der zytoplasmatischen Domäne des AchR. Dies würde in einer veränderten Signalweiterleitung zu endozytischen und proteolytischen Mechanismen resultieren, die in den Rezeptorstoffwechsel involviert sind (Peng et al., 1994) und durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) vermittelt werden (Christianson & Green, 2004). Vareniclin stimuliert den nAChR mit einer geringeren, partialagonistischen Aktivität als Nikotin. Dass jedoch die nAChR-Hochregulation nicht an die Ionenkanalaktivität gebunden war, erklärte sich aus der beobachteten Hochregulation infolge Bindung des nicht kompetitiven Antagonisten Mecamylamin (Peng et al., 1994) und weiterer Antagonisten (Gopalakrishnan et al., 1997). Zudem demonstrierte der  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR Partialagonist Cytisin eine Erhöhung der [ $^3$ H]Cytisinbindung auf annähernd das Niveau wie Nikotin (Gopalakrishnan et al., 1997). Aus diesem Grund wäre dieser für Nikotin postulierte Wirkmechanismus einer veränderten Degradationsrate ebenfalls vorstellbar für die Vareniclin-induzierte Hochregulation. Das Ubiquitin-Proteasom-System vermittelt nicht nur Endozytose und Proteolyse von Oberflächenrezeptoren, sondern ist ebenfalls an der

ER-assoziierten Degradation von falsch gefalteten Proteinen und nicht-aggregierten Untereinheiten von Oligomeren beteiligt (Christianson & Green, 2004). Für Nikotin ist eine direkte Inhibition des Proteasoms bereits nachgewiesen worden, die mit einer Erhöhung der ubiquitinierten  $\alpha_7$ -Rezeptorendichte assoziiert wurde (Rezvani et al., 2007). Dieser Befund ging einher mit dem infolge Überexpression von Ubiquilin-1 vorangetriebenen Abbaus von nicht-aggregierten nAChR-Untereinheiten, deren Zusammenlagerung und verstärkte Expression infolge Nikotinexposition unterbunden wurde (Ficklin et al., 2005). Für Vareniclin wäre eine direkte Interaktion mit dem UPS ebenfalls denkbar, denn die Proteasominhibition durch Nikotin wurde zumindest teilweise über die Aktivierung von nAChR vermittelt (Rezvani et al., 2007) und eine Membranpermeabilität von Vareniclin war aufgrund seiner lipophilen Struktur denkbar. Da die Zellhomogenate und membranären Fraktionen eine Hochregulation ähnlicher Effizienz aufwiesen, sind Effekte eines verstärkten exozytotischen Rezeptortraffickings von intrazellulären Pools zur Membran – wie für Nikotin angenommen (Darsow et al., 2005) – unwahrscheinlich.

Die Expression von nAChR beschränkte sich nicht nur auf Neuronen, sondern wurde ebenfalls auf verschiedenen, nicht-erregbaren Zelltypen nachgewiesen (Kumar & Meizel, 2005; Arredondo et al., 2008), einschließlich Keratinozyten (Grando et al., 1995; Arredondo et al., 2008), Zellen des Knochenmarks (Koval et al., 2008), Endothelzellen (Villablanca, 1998; Heeschen et al., 2001; Heeschen et al., 2002; Cooke & Ghebremariam, 2008) oder vaskulären Muskelzellen (Shanker et al., 2006). Aus diesem Grund war es nicht verwunderlich, dass bEnd.3 Zellen ebenfalls  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR exprimierten. Zur Aufklärung der Frage, ob die *in vivo* beobachtete Hochregulation in differenzierten Gehirnstrukturen als Folge einer Neuron- oder vaskulär gesteuerten Regulation in Erscheinung trat, wurden mikrovaskuläre Endothelzellen (bEnd.3 Zellen) durch Vareniclinstimulation getestet. Bei bEnd.3 Zellen handelt es sich um murine cerebrale Endothelzellen, welche mit Polyoma middle T Onkogenen (Williams et al., 1989) transformiert wurden (Zhang et al., 2006). Diese Zellen wiesen im Vergleich zu Primärkulturen eine unbegrenzte Teilbarkeit und zelluläre Homogenität auf (Zhang et al., 2006). bEnd.3 Zellen illustrierten nach Inkubation mit Vareniclin eine Hochregulation der Untereinheiten des  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR (s. **Abbildung 3.18**), welche posttranskriptional gesteuert war (s. **Abbildung 3.19**). Da infolge Nikotinexposition ebenfalls eine Hochregulation in transfizierten murinen Fibroblasten (Peng et al., 1994; Bencherif et al., 1995; Rothhut et al., 1996; Whiteaker et al., 1998) oder

HEK Zellen (Eilers et al., 1997; Gopalakrishnan et al., 1997) beobachtet wurde, implizierten solche Befunde, dass die Ligand-gesteuerte Hochregulation des Rezeptors keine spezifische Eigenschaft von Neuronen, sondern des nAChR selbst darstellt. Da die Hochregulation in neuronalen (s. **Abbildung 3.13**) und cerebralen Endothelzellen (s. **Abbildung 3.18**) ähnlich ausgeprägt war, kann auf Basis dieser Befunde keine Aussage zum Beitrag neuronaler und cerebraler nAChR hinsichtlich der Vareniclin-induzierten Hochregulation *in vivo* getroffen werden.

### 4.1.3. Effekt von Vareniclin auf die Objektwiedererkennung

Die Objektwiedererkennung als eine Form des deklarativen Gedächtnisses - definiert als die Kapazität der bewussten Erinnerung von Fakten und Ereignissen (Squire & Zola, 1996; Winters et al., 2008) – wurde die Methode der Wahl zur Beurteilung von Aspekten deklarativer Erinnerung in Nagern, welche weder die Anwendung extensiver Trainingsprotokolle noch motivierender Faktoren ausnutzt (Rollema et al., 2009b). Die initial für Ratten entwickelte Objektwiedererkennung (Ennaceur & Delacour, 1988) wurde unter Berücksichtigung minimaler Adaptationen für Mäuse übernommen (Dodart et al., 1997; Messier, 1997; Dere et al., 2007). Sie basiert auf dem spontanen Verhalten von Nagern, neuartige Objekte gegenüber bekannten Objekten präferentiell zu explorieren (*Novelty preference paradigm*) (Dere et al., 2007).

In der vorliegenden Studie wurde zunächst der Fragestellung nachgegangen, ob die Objektwiedererkennung zur Testung pharmakologischer Interventionen, beispielsweise promnestischer Substanzen, geeignet sei. Die Durchführung von Pilotexperimenten diente dabei dem Ausschluss einer Präferenz der Versuchstiere zu einem der gewählten Objekte oder Positionen im Offenfeld (s. **3.1.3.1.1**). Verschiedene Retentionsintervalle zwischen den Versuchsdurchgängen wurden getestet, um die Objektwiedererkennung und das Einsetzen des Vergessens bei den gewählten experimentellen Bedingungen zu evaluieren. C57BL/6-Mäuse erkannten das bekannte Objekt 50 min nach Akquisition (s. **Abbildung 3.21**). Zwischen 50 min und 3 h setzte der Verlust der Gedächtnisleistung ein und nach einem dreistündigen Verzögerungsintervall zwischen beiden Versuchsdurchgängen konnte keine Diskriminationsleistung zugunsten des neuartigen Objektes ermittelt werden (s. **Abbildung 3.22**). Diese Daten sind im Einklang mit einem Verlust der Objektwiedererkennung innerhalb von 1-2 h in C57BL/6-Mäusen (Bertaina-Anglade et al.,

2006) und 1-4 h in Abhängigkeit der verwendeten Mauslinie (Sik et al., 2003). In der Regel nimmt die Gedächtnisleistung der Versuchstiere mit zunehmender Länge des Retentionsintervalls ab (Obinu et al., 2002; Bertaina-Anglade et al., 2006; Dere et al., 2007), obgleich die exakten Kurvenverläufe einer Beeinflussung von verschiedenen Faktoren unterliegen, beispielsweise der Dauer der Testdurchläufe oder des verwendeten Tierstammes (Dere et al., 2007) und individuell bestimmt werden müssen. Ein drittes Verzögerungsintervall mit kurzer Dauer (10 min) wurde in C57BL/6-Mäusen getestet. **Abbildung 3.23** illustriert das Ausbleiben der Objektwiedererkennung bei der Anwendung einer 10minütigen Retentionszeit. Mögliche Ursachen für den Verlust der Objekterkennung nach dieser kurzen Zeitspanne könnten die Interferenz der Objektinformationen und nicht eindeutigen Zuordnung der Gedächtnisinhalte durch die Versuchstiere darstellen. Diese Retentionsintervalle (50 min, 3 h, 10 min) dienen in nachfolgenden Studien der Untersuchung potenziell mnestischer Effekte von Vareniclin. Der Partialagonist an  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR und Vollagonist an  $\alpha_7$ -nAChR (Mihalak et al., 2006) – Subtypen von Rezeptoren, welche mit kognitiven Funktionen in Verbindung gebracht wurden (Levin et al., 2006) – wurde in einer einzigen Studie hinsichtlich seiner Effekte auf deklarative Gedächtnisleistungen in der Objekterkennung getestet (Rollema et al., 2009b). Im Tiermodell induzierte Vareniclin eine signifikant längere Explorationszeit am neuartigen Objekt im Vergleich zum bekannten Objekt nach einem Retentionsintervall von 24 h. Die Applikation von Vareniclin (0,1; 0,32; 1,0; 3,2 mg/kg) führte zu einer dosisabhängigen Verbesserung der Objekterkennung in einer Dosierung von 0,32 mg/kg aufwärts (Rollema et al., 2009b). In der vorliegenden Studie wurde Vareniclin (3 mg/kg/d) in verschiedenen Retentionsintervallen in C57BL/6-Mäusen getestet. Nach 50 min diskriminierten mit Vareniclin vorbehandelte Versuchstiere das neuartige und bekannte Objekt (s. **Abbildung 3.24**). Dies kennzeichnete deren Fähigkeit zur Objektwiedererkennung. Dieser Befund weist auf keinen amnestischen Effekt von Vareniclin hin. Dieses Ergebnis ist vor dem Hintergrund interessant, dass der Nikotinverzicht mit einem Abfall kognitiver Leistungen assoziiert wird und die Raucherentwöhnung die eigentliche Indikation der Substanz darstellt.

Weitergehende Untersuchungen galten dem potenziell promnestischen Effekt der Substanz. Vorangegangene Studien evaluierten Verzögerungsintervalle von 3 h und 10 min als Zeitspannen, nach welchen Kontrolltiere keine Objektwiedererkennung abrufen können. Diese Retentionsintervalle wurden in den mit Vareniclin vorbehandelten

C57BL/6-Mäusen getestet. Sowohl bei einem Verzögerungsintervall von 3 h als auch 10 min veranschaulichte die Vorbehandlung mit Vareniclin keine Diskriminationsleistung der getesteten Versuchstiere. Aus diesem Grund muss postuliert werden, dass Vareniclin keine Effekte auf die Objekterkennung in C57BL/6-Mäusen *per se* ausübte – dieses Ergebnis stand im Kontrast zu dem promnestischen Effekt von Vareniclin in der Studie von Rollema et al. (Rollema et al., 2009b), obgleich für Verhaltensexperimente eine hohe Variabilität der Versuchsergebnisse bereits beschrieben wurde (Dere et al., 2007).

Eine Vielzahl von Erklärungsansätzen kann mögliche Ursache für die Unstimmigkeit der Daten sein, einschließlich Unterschiedlichkeiten in der Unterbringung der Versuchstiere, des verwendeten Nagerstamms, Alter und Geschlecht der Versuchstiere, Tagesuhrzeit der Durchführung der Experimente, Länge des Retentionsintervalls, Auswahl der Objekte und Größe und Beleuchtung der Apparatur (Dere et al., 2007). Ein wichtiger Unterschied war die Verwendung von Ratten in der Studie von Rollema et al. im Vergleich zu den in unserer Studie eingesetzten C57BL/6-Mäusen. Im Vergleich zu Ratten veranschaulichten Mäuse eine signifikant verringerte Explorationsneigung, vermutlich infolge einer Objekt-induzierten Neophobie, die eine Verlängerung der Versuchsdurchgänge nötig erscheinen lässt (Dere et al., 2007). Bislang existierte nur eine Studie, welche Ratten und Mäuse hinsichtlich ihrer kognitiven Leistung in der Objektwiedererkennung verglich. Bertaina-Anglade et al. demonstrierten, dass der Verlust der Objekterkennung in männlichen Sprague-Dawley Ratten nach 3-4 h einsetzte im Vergleich zu männlichen C57BL/6-Mäusen, welche bereits nach 1-2 h ihre Diskriminationsfähigkeit verloren (Bertaina-Anglade et al., 2006). Diese Befunde spiegeln eine *per se* verbesserte kognitive Leistung von Ratten in der Objekterkennung wider, welche im Einklang ist mit Befunden aus anderen das Gedächtnis betreffenden Aufgabenstellungen, beispielsweise im Morris Wasserlabyrinth (Whishaw & Tomie, 1996). Ein weiterer wesentlicher Unterscheidungspunkt bei Vergleich beider Studien war die Anwendung von Retentionsintervallen unterschiedlicher Dauer. Während Rollema et al. nach Anwendung eines Intervalls von 24 h Effekte von Vareniclin auf das Langzeitgedächtnis postulierten (Rollema et al., 2009b), wurden in der vorliegenden Studie keine promnestischen Effekte auf das Kurzzeitgedächtnis bzw. Arbeitsgedächtnis beobachtet. Die Bewertung dieser Effekte erschien wichtig aufgrund der früh beeinträchtigten Funktion des Kurzzeitgedächtnisses bei Patienten mit *Morbus Alzheimer* (Bekris et al., 2010), für die Vareniclin eine potenzielle therapeutische Therapieoption darstellen könnte. Zu erwähnen

war ebenfalls die unterschiedliche Art der Applikation in beiden Studien – oral versus subkutan. Aus diesem Grund stellte sich die hypothetische Frage der ausreichenden Resorption und Metabolisierungsrate der Substanz nach oraler Applikation. Die Bestimmung der täglichen Flüssigkeitsaufnahme veranschaulichte die Aufnahme von Vareniclin über das Trinkwasser (s. **Abbildung 3.1**). Pharmakokinetische Daten aus der Maus wiesen eine geringe Biotransformation (90% unveränderte Ausscheidung) infolge der oralen Verabreichung von Vareniclin (3 mg/kg) nach (Obach et al., 2006) und Rollema et al. demonstrierten eine 67prozentige und ausreichend ungebundene Konzentration der Substanz (oral, 1 mg/kg) im Gehirn der Ratte (Rollema et al., 2010). Da Vareniclin nach oraler Verabreichung die Expression zentraler  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR signifikant regulierte, kann eine unzureichende Resorption, Gehirnpenetration oder hohe Metabolisierungsrate das Ausbleiben der Objektwiedererkennung infolge Vareniclinexposition nicht erklären. Der fehlende Effekt von Vareniclin auf die Objekterkennung ist auch vor dem Hintergrund interessant, dass eine jüngst abgeschlossene klinische Studie ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov); NCT00744978) keine Unterschiede zwischen einer sechswöchigen Intervention mit Vareniclin oder Placebo im ADAS-Cog75 (*Alzheimer`s Disease Assessment Scale-Cognitive Subscale 75*), einer 12-Elementeskala zur Bewertung der Schwere der kognitiven Beeinträchtigung bei Patienten mit AD, demonstrieren konnte.

### **4.1.4. Effekt von Vareniclin auf das räumliche Objektgedächtnis**

Eine Vielzahl von Studien beleuchtete die Bedeutung des präfrontalen Cortex (Kesner et al., 1996), des perirhinalen Cortex (Aggleton et al., 1997; Barker et al., 2007) und des Hippocampus (Mumby et al., 2002) bei Aspekten der Wiedererkennung (Schäble et al., 2012). Es war hinreichend belegt, dass Strukturen des Cortex – insbesondere der perirhinale Cortex - in zugrundeliegenden Mechanismen der Objektwiedererkennung involviert sind (Barker et al., 2007). Für einen Beitrag des Hippocampus an dieser Aufgabenstellung hingegen existierten kontroverse Studienergebnisse (Broadbent et al., 2004; Winters et al., 2004). Zur Bestätigung des fehlenden Einflusses von Vareniclin auf die Kognition wurden Untersuchungen zur räumlichen Gedächtnisleistung durchgeführt, für die der Hippocampus eine entscheidende funktionelle Struktur darstellt (Winters et al., 2004). Diese Abwandlung der Objektwiedererkennung wurde definiert als die verstärkte Explorationsneigung zum Objekt, welches sich in einer veränderten Position befand im

Vergleich zum stationären Objekt (Dere et al., 2007; Schäble et al., 2012). Zunächst wurde das Verhalten der Kontrolltiere hinsichtlich ihrer Explorationsneigung zu beiden Objekten getestet. Ein Verzögerungsintervall von 50 min nach erstmaliger Objektpräsentation ergab einen eindeutigen Trend der Explorationsneigung in Richtung des neu positionierten Objektes, obgleich die statistische Signifikanz ausblieb (s. **Abbildung 3.27**). Da die Versuchstiere eine hohe Variabilität der Explorationszeiten erkennbar werden ließen, wurde der Diskriminationsindex zu Hilfe gezogen, welcher die Diskriminationsfähigkeit des Tieres unter Berücksichtigung seiner Gesamtexplorationszeit erfasste und mit einer statistischen Signifikanz gegenüber dem Testwert 0,5 auf räumliche Objekterkennung hindeutete. Da aus den Versuchen zur Objektwiedererkennung ein Verlust der Gedächtnisleistung infolge der Verlängerung des Retentionsintervalls ersichtlich war, wurde das räumliche Objektgedächtnis nach einem dreistündigen Intervall nach Akquisition getestet. Zwischen 50 min und 3 h verloren die Kontrolltiere ihre Diskriminationsfähigkeit zugunsten des neu positionierten Objektes. Dieser Befund veranschaulichte eine ähnliche Bewahrung der Objektinformationen in räumlichen und nicht-räumlichen Aufgabenstellungen unabhängig von den involvierten Gehirnstrukturen und stand in Kontrast zu einer schlechteren Leistung des räumlichen Objektgedächtnisses im Vergleich zu Objektwiedererkennung in der Studie von Pitsikas. Hierbei muss allerdings berücksichtigt werden, dass diese Studienbefunde an Ratten erhoben wurden (Pitsikas, 2007).

Das Retentionsintervall von 3 h wurde in nachfolgenden Studien zur Evaluierung potenzieller Effekte von Vareniclin auf die räumliche Gedächtnisleistung angewendet. Der in **Abbildung 3.28** illustrierte unveränderte Diskriminationsindex der Interventionsgruppe im Vergleich zur Kontrolle deutete auf Nicht-Erkennen des Objektes in der neuen Position hin. Auf Basis dieses Befundes muss postuliert werden, dass Vareniclin in überwiegend Hippocampus-abhängigen Aufgabenstellungen – räumliches Objektgedächtnis - unter den gewählten Bedingungen keinen promnestischen Effekt ausübte.

#### **4.1.5. Effekt von Vareniclin auf das Scopolamin-induzierte Defizit bei Objektwiedererkennung**

Frühe Untersuchungen der 80er Jahre korrelierten die Dysfunktion cholinergischer Neurotransmission mit dem Auftreten altersabhängiger kognitiver Beeinträchtigungen (Bartus et al., 1982). In der Folge wurden Substanzen getestet, welche promnestische Effekte über die Verstärkung der cholinergen Signalweiterleitung ausübten (Masuoka & Kamei, 2009). Heutzutage gilt als wissenschaftlich gesichert, dass cholinerge Mechanismen an kognitiven Prozessen, die das Lernen und Gedächtnis betreffen, beteiligt sind (Sarter et al., 2003; Gold, 2003a; Gold, 2003b; Parent & Baxter, 2004; Hasselmo, 2006). Es bestehen Hinweise darauf, dass die mit der Pathogenese von *Morbus Alzheimer* einhergehenden kognitiven Defizite einer Verarmung an neocorticalen und hippocampalen Acetylcholin zugrunde liegen (Dere et al., 2007) und dass die Läsion des basalen Vorderhirns, beispielsweise durch 192 IgG-Saporin, mit Defiziten in Lernen und Gedächtnis betreffenden Aufgaben einhergeht (Wrenn & Wiley, 1998). In Übereinstimmung mit der Bedeutung der Intaktheit des basalen Vorderhirns, welches zu corticalen und limbischen Arealen mit der Beteiligung an kognitiven Prozessen projiziert (Dere et al., 2007), demonstrierte die Injektion des cholinergen Immunotoxins in den perirhinalen Cortex von Ratten deren signifikant verschlechterte kognitive Leistung in der Objekterkennung aufgrund der selektiven Reduktion cholinergischer Stimuli in diese Region (Winters & Bussey, 2005). Pharmakologische Studien bestätigten die anhand von Läsionen cholinergischer Neuronen entstandenen Studienbefunde und demonstrierten eine Veränderung der cholinergen Neurotransmission mit Bedeutung für die Objekterkennung (Dere et al., 2007). Scopolamin, ein Antagonist an muskarinischen AchR, wurde hinsichtlich seiner amnestischen Wirkung in einer Reihe von kognitiven Aufgabenstellungen getestet, unter anderem in der Objektwiedererkennung (Ennaceur & Meliani, 1992; Bartolini et al., 1996; Dodart et al., 1997; Bertaina-Anglade et al., 2006; de Bruin & Pouzet, 2006; Sambeth et al., 2007; Botton et al., 2010) und der räumlichen Objekterkennung (Pitsikas, 2007; Barker & Warburton, 2009; Schäble et al., 2012). Der Gebrauch von Scopolamin zur Generierung einer „cholinergen Amnesie“ (Klinkenberg & Blokland, 2010) wurde als pharmakologisches Modell für Patienten mit (Alzheimer-) Demenz mit der Ursache einer reduzierten cholinergen Funktion postuliert (Flood & Cherkin, 1986). Die Substanz ist der Beurteilung cholinergischer Mechanismen in Prozessen des Lernens und Gedächtnisses (Schäble et al., 2012) und der Testung neuartiger, kognitiv verstärkender Substanzen bei

kognitiver Dysfunktion dienlich (Snyder et al., 2005).

Das Ziel dieser Untersuchung war die Bewertung des Effekts von Vareniclin auf die Objektwiedererkennung in Kombination mit dem muskarinischen Antagonisten Scopolamin. Das Retentionsintervall von 50 min wurde gewählt, da Kontrolltiere innerhalb dieser Zeitspanne zur Diskriminationsleistung zwischen dem neuartigen und bekannten Objekt und Demonstration von Objektwiedererkennung fähig waren (s. **Abbildung 3.21**). Literaturbefunde bestätigten die erbrachte Gedächtnisleistung von C57BL/6-Mäusen in der Objekterkennung innerhalb einer Stunde nach Akquisition (Dodart et al., 1997; Bertaina-Anglade et al., 2006). In der vorliegenden Studie führte die Injektion mit Scopolamin (0,5 mg/kg, i.p) zu einer Beeinträchtigung der Diskriminationsleistung zwischen dem neuartigen und bekannten Objekt in den getesteten Mäusen (s. **Abbildung 3.29**). Dieser Befund war ebenfalls im Einklang mit Literaturdaten, die eine amnestische Wirkung von Scopolamin in Dosen von 0,3-1 mg/kg in Mäusen unter Anwendung eines einstündigen Retentionsintervalls demonstrierten (Bertaina-Anglade et al., 2006). Der Verlust der Objekterkennung infolge der vor dem ersten Versuchsdurchgang angewendeten Injektion lässt auf die beeinträchtigte Enkodierung und Akquisition der wahrgenommenen Objektinformationen schließen (Winters et al., 2008) und stand im Einklang mit der Funktion des perirhinalen Cortex in Objektidentifikation (Murray & Richmond, 2001; Winters et al., 2008) und Prozessierung von Objektinformationen (Buckley & Gaffan, 1998; Bartko et al., 2007). Als Ursache für das induzierte kognitive Defizit wurde die Blockade von muskarinischen AchR – Rezeptoren, welche für kognitive Prozesse entscheidend sind (Levin et al., 2006) – durch Scopolamin postuliert. Es war jedoch zu erwähnen, dass die systemische Applikation von Scopolamin eine Steigerung der Lokomotion in den behandelten Versuchstieren induzierte (s. **Abbildung 3.31**). Dieser Befund war nicht verwunderlich, da in einer Fülle von vorangegangenen Studien hyperlokomotorische Effekte von Scopolamin in Ratten (Mueller & Peel, 1990; Day et al., 1991; Bertrand et al., 2001; Chintoh et al., 2003) und Mäusen (Dodart et al., 1997; Chintoh et al., 2003; Bertaina-Anglade et al., 2006; de Bruin & Pouzet, 2006) beobachtet wurden. Für Scopolamin wurde eine Beeinflussung der Mobilität bereits bei einer Konzentration von 0,056 mg/kg beschrieben (Klinkenberg & Blokland, 2010). Nebenwirkungen der Scopolamininjektion waren wahrscheinlich, denn die Substanz wurde systemisch verabreicht und zeigte keine Selektivität an den 5 Subtypen von mAChR mit Dissoziationskonstanten zwischen 0,4 nM (M<sub>3</sub>) und 2,1 nM (M<sub>5</sub>) (Bolden et al., 1992)

sowie in hohen Dosen Affinität zu nAChR (Schmeller et al., 1995; Sambeth et al., 2007). Weitergehende Untersuchungen sollten der Erstellung von Dosis-Wirkungskurven dienen, um die effizienteste Dosis von Scopolamin zur Generierung von Amnesie ohne Induktion einer Hyperlokomotion zu ermitteln.

Da Vareniclin bei Änderung des Retentionsintervalls keine Verbesserung der Objekterkennung im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren demonstrierte, wurde das Scopolamin-induzierte Defizit zur Testung promnestischer Effekte des Partialagonisten angewandt. Effekte von Testsubstanzen auf Pharmakon-induzierte kognitive Defizite, die bei alleiniger Verabreichung der Substanz ausblieben, sind bereits von anderen Autoren beschrieben worden (Shannon et al., 1990; Murray et al., 1991). Die Evaluation des Effekts von Vareniclin bei kognitiven Defiziten war vor allem auch unter dem Aspekt interessant, dass Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen im Allgemeinen eine beeinträchtigte Objektwiedererkennung aufweisen (Purdy et al., 2002; Laatu et al., 2003; Hajilou & Done, 2007; Winters et al., 2008). Die Vorbehandlung mit Vareniclin führte zu einer Veränderung des Diskriminationsindex, welcher im Vergleich zur Scopolamin-behandelten Versuchstiergruppe nicht signifikant verschieden ermittelt werden konnte (s. **Abbildung 3.30**). Da Vareniclin den Diskriminationsindex bis auf Kontrollebene normalisierte (keine Signifikanz versus Vehikel) kann von einer zumindest partiellen Wiederherstellung des Scopolamin-induzierten kognitiven Defizits ausgegangen werden. Diese unvollständige Aufhebung des kognitiven Defizits könnte ihre Ursache in der Interaktion mit nAChR finden und wurde für Scopolamin nach Applikation hoher Dosen bereits beschrieben (Schmeller et al., 1995). Eine weitere mögliche Erklärung für den partiellen prokognitiven Effekt könnte die Scopolamin-induzierte Hyperlokomotion mit der möglichen Folge von Interferenzen in der Objektwiedererkennung der Vareniclin-behandelten Tiere darstellen.

Dieser Befund ließ den Schluss zu, dass Vareniclin Aspekte des deklarativen Gedächtnisses bei Vorliegen einer beeinträchtigten Kognition positiv beeinflussen kann, beispielsweise über die Verbesserung der Akquisition von Objektinformationen – ein Effekt, wie er für Nikotin und die Acetylcholinesterase-Inhibitoren bereits beschrieben wurde (Puma et al., 1999; Prickaerts et al., 2005). Diese letzteren Substanzen, beispielsweise Donepezil, Galantamin und Rivastigmin, verstärken die cholinerge Neurotransmission durch Inhibition der Acetylcholinesterase (Lenzken et al., 2007) mit der Folge verbesserter kognitiver Leistungen in klinischen Studien (Ritchie et al., 2004). Eine

verstärkte Neurotransmission wurde ebenfalls durch den nAChR-Liganden TC-1734 infolge der Induktion corticaler Acetylcholinfreisetzung ermittelt. TC-1734 führte zu einer Verbesserung der Objekterkennung in Mäusen 24 h nach Objektpräsentation. Da die Diskriminationsleistung infolge der Applikation des nAChR-Antagonisten Mecamylamin geblockt werden konnte, wies dies auf die Vermittlung kognitiver Effekte von TC-1734 über nAChR hin (Obinu et al., 2002). Kognitive Effekte wurden ebenfalls mit weiteren nAChR-Liganden ermittelt. Der selektive  $\alpha_7$ -Agonist AR-R17779 führte zu einer Verbesserung der Scopolamin-induzierten kognitiven Beeinträchtigung des Kurzzeitgedächtnisses über die Aktivierung von  $\alpha_7$ -Rezeptoren (Van Kampen et al., 2004). Der nAChR-Agonist SIB-15538 verbesserte die Gedächtnisleistung in Scopolamin-behandelten Mäusen – dieser Effekt war antagonisierbar durch Mecamylamin (Bontempi et al., 2003). Vareniclin stimuliert nAChR-Rezeptoren (Mihalak et al., 2006; Cahill et al., 2012) und verbesserte die Scopolamin-induzierte beeinträchtigte Objekterkennung (s. **Abbildung 3.30**). Dieser Befund ging einher mit Studienergebnissen, die die Wirksamkeit von nikotinergen Agonisten bei der Verbesserung kognitiver Defizite im Tiermodell belegten (Bontempi et al., 2003; Van Kampen et al., 2004). Es wäre denkbar, dass Vareniclin die cholinerge Neurotransmission verstärkte durch die Aktivierung präsynaptischer nAChR – konsistent mit deren Rolle in der Regulation der Neurotransmitterfreisetzung (Wonnacott et al., 1990). Die Stimulation präsynaptischer nAChR führt über den gesteigerten Natriumeinstrom zu einer Depolarisation der Zelle mit der Folge der Aktivierung lokaler spannungsabhängiger Calciumkanäle (Wonnacott, 1997). Zudem wurde für den nAChR selbst eine Calciumpermeabilität beschrieben (Mulle et al., 1992), die unabhängig von spannungsabhängigen Calciumkanälen eine Exozytose induzieren kann (Wonnacott, 1997). Bei Vorliegen einer geringen neuronalen Aktivität – beispielsweise im Rahmen eines kognitiven Defizits - könnte dies bedeuten, dass Vareniclin agonistisch an präsynaptischen nAChR bindet und so die calciumabhängige Transmitterfreisetzung erhöht. Die Folge wäre eine Stimulation zuvor Scopolamin-blockierter mAChR und nAChR durch Acetylcholin. Es wäre ebenfalls vorstellbar, dass Vareniclin direkt postsynaptische nAChR aktiviert und so die muskarinerge Blockade aufheben könnte. Ähnliche Effekte wurden für den nAChR-Liganden SIB-15538 postuliert (Bontempi et al., 2003). Da Vareniclin eine Hochregulation des funktionalen  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR *in vivo* (Turner et al., 2011; Hussmann et al., 2012) und *in vitro* (Hussmann et al., 2012) induzierte, sowie seine Untereinheiten regulierte (s. **Abbildung 3.2**, **Abbildung 3.3**,

**Abbildung 3.7, Abbildung 3.8, Abbildung 3.13**), war eine Potenzierung der cholinergen Neurotransmission über diese Signalwege denkbar und mögliche Ursache des prokognitiven Effekts von Vareniclin. Hingegen liegt es nahe, das Ausbleiben der Objektwiedererkennung bei normaler neuronaler Aktivität anhand des antagonistischen Prinzips des Partialagonisten zu erklären. Da Vareniclin ebenfalls vollagonistisch an  $\alpha_7$ -nAChR bindet (Mihalak et al., 2006), verbleibt deren Beteiligung an Vareniclin-induzierten Effekten auf die Kognition aufzuklären.

Die Wiederherstellung der Scopolamin-induzierten Beeinträchtigung der Objekterkennung ließ den Schluss zu, dass der kognitive Effekt von Vareniclin vor allem über Strukturen des Cortex vermittelt wird, obgleich die Beteiligung des Hippocampus an Fragestellungen der Objektwiedererkennung ebenfalls postuliert wurde (Broadbent et al., 2004). Da nAChR im Hippocampus durch Vareniclin ebenfalls eine Regulation erfahren, bleibt aufzuklären, inwiefern Vareniclin unter Ausnutzung des Defizitmodells Effekte ausübt, welche in erster Linie über den Hippocampus ablaufen.

Ebenso wie Scopolamin wurde Vareniclin hinsichtlich seiner Effekte auf die lokomotorische Aktivität getestet. Im Unterschied zu Scopolamin induzierte Vareniclin keine Hyperlokomotion (s. **Abbildung 3.32**). Da nAChR des mesolimbischen Systems, unter anderem  $\alpha_4\beta_2^*$ -nAChR die Nikotin-vermittelten systemischen Effekte auf die lokomotorische Aktivität regulieren (Kim et al., 2011) und Nikotin in einer Konzentration von 0,1 mg/kg bereits Hyperlokomotion induzierte (Benwell & Balfour, 1992), wäre es möglich, dass der ausbleibende Effekt von Vareniclin auf die lokomotorische Aktivität sich über dessen partialagonistische Wirkung an  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR erklärt. Dieses Ergebnis war im Einklang mit Studienbefunden einer unveränderten Lokomotion infolge Vareniclininjektion (Kim et al., 2011; King et al., 2011), obgleich Zaniewska et al. Effekte von Vareniclin auf die basale lokomotorische Aktivität in Ratten bei Konzentrationen von 0,3-3 mg/kg berichteten (Zaniewska et al., 2008).

### **4.1.6. nAChR-Hochregulation als Ursache promnestischer Effekte**

Die Anwendung eines mit kognitiven Dysfunktionen einhergehenden Defizitmodells führte zu einer mindestens partiellen Wiederherstellung der Objektwiedererkennung. Die infolge der Blockade von muskarinischen AchR verstärkte Ausnutzung von Signalwegen über hochregulierte nikotinische AchR bei kognitiven Prozessen könnte diesem Befund

zugrunde liegen. Die Expression von nAChR in Cortex und Hippocampus - Gehirnregionen, welche mit Lernen und Gedächtnis assoziiert werden (Schäble et al., 2012) - und deren regulatorische Beeinflussung durch Vareniclin kennzeichnete diese als Schauplätze Vareniclin-vermittelter kognitiver Effekte. Die Fähigkeit von Vareniclin zur Hochregulation von  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR in diesen Gehirnstrukturen und die verbesserte Gedächtnisleistung in einem mit kognitiven Defiziten einhergehenden Tiermodell weisen dieser Substanz eine potenzielle Rolle zu bei der Behandlung kognitiver Dysfunktionen bei *Morbus Alzheimer*. Die therapeutische Ausnutzung der Testsubstanz ist ebenfalls vor dem Hintergrund interessant, dass Partialagonisten wie Vareniclin im Vergleich zu Liganden mit hoher intrinsischer Aktivität an nAChR ein geringerer missbräuchlicher Effekt zugeschrieben wird (McColl et al., 2008).

Obleich der prokognitive Effekt von Vareniclin mit einer erhöhten Rezeptorexpression des  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR korrespondierte, erlaubte die vorliegende Studie keine Bewertung einer direkten Korrelation von Rezeptordichte und Gedächtnisleistung. Für Agonisten von nAChR wurden langanhaltende kognitive Effekte im Tiermodell und Menschen gemessen, die nach Beendigung des Therapieregimes im Körper persistierten (Briggs et al., 1997; Newhouse et al., 2001; Gould & Higgins, 2003; Buccafusco et al., 2005). Beispielsweise wies Iproniclin, ein Partialagonist an  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR, eine Verbesserung des Kurz- und Langzeitgedächtnisses 1-18 h nach Applikation auf (Gatto et al., 2004), trotz einer schnellen Kinetik (Halbwertszeit~ 1 h) und der Inaktivität von Metaboliten an nAChR (Buccafusco et al., 2005). Diese Diskrepanz zwischen Pharmakokinetik und Pharmakodynamik wurde auf langanhaltende zelluläre und systemische Adaptationen infolge der Aktivierung von nAChR zurückgeführt (Buccafusco et al., 2005). Es waren Abdulla et al. (1996), welche eine verbesserte Kognition von Nikotin nach Beendigung der Exposition demonstrierten und diesen Effekt mit einer gesteigerten [<sup>3</sup>H]Nikotinbindung – spezifische Bindungsneigung zu heterogenen nAChR – positiv korrelierten (Abdulla et al., 1996; Thomsen et al., 2011). Dieser Effekt wurde durch das Ausbleiben der erhöhten Radioligandbindung im Hippocampus infolge Mecamylaminbehandlung bestätigt, welche mit einer beeinträchtigten kognitiven Leistung im Morris Wasserlabyrinth assoziiert war (Abdulla et al., 1996). Ähnliche Befunde konnten für spezifische Agonisten oder Partialagonisten des  $\alpha_7$ -nAChR erhoben werden. Werkheiser et al. (2011) testeten den  $\alpha_7$ -Partialagonisten AZD0328 mit dem Ergebnis einer verbesserten Objektwiedererkennung, die mit einer gesteigerten [<sup>125</sup>I]Bungarotoxinbindung 4-48 h nach Applikation

korrespondierte (Werkheiser et al., 2011). Thomsen et al. (2011) wiesen für den  $\alpha_7$ -nAChR-Agonisten A582941 ebenfalls eine Verbesserung der Gedächtnisleistung nach. Die verbesserte kognitive Leistung war von einer signifikanten Hochregulation von  $\alpha_7$ -nAChR in Arealen des Cortex begleitet, obgleich kein direkter Zusammenhang zwischen Rezeptordichte und Kognition detektiert werden konnte (Thomsen et al., 2011). Der  $\alpha_7$ -nAChR-Agonist A582941 demonstrierte Effekte in einer Vielzahl von kognitiven Domänen einschließlich des Arbeits-, Kurz - und Langzeitgedächtnisses (Tietje et al., 2008). Da hochregulierte nAChR infolge Agoniststimulation funktionell aktiv sind (Nguyen et al., 2004) und mit positiven Effekten auf das Gedächtnis assoziiert wurden (Abdulla et al., 1996; Buccafusco et al., 2005), ließ sich auf Basis der dargestellten Studienbefunde in Erwägung ziehen, dass die erhöhte Expression der Untereinheiten des  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR infolge Vareniclinexposition zu den prokognitiven Eigenschaften dieser Substanz via cholinergischer Modulation beiträgt. Diese Hypothese ging einher mit einer Verbesserung der Objekterkennung infolge der Stimulation mit nAChR-Liganden (Puma et al., 1999; Schäble et al., 2012) und einer beeinträchtigten kognitiven Leistung durch den cholinergen Antagonisten Scopolamin (Ennaceur & Meliani, 1992; Bartolini et al., 1996; Dodart et al., 1997; Woolley et al., 2003; Sambeth et al., 2007; Schäble et al., 2012). Eine Vielzahl von Mechanismen, einschließlich der nAChR-Hochregulation, der Induktion einer gesteigerten Expression von NGF oder ein gesenkter Schwellenwert zur Generierung von LTP – nAChR-Liganden produzieren LTP (Buccafusco et al., 2005) – wurde als mögliche Ursache anhaltender kognitiver Effekte postuliert (Thomsen et al., 2011). Infolge der Aktivierung von nAChR werden calciumabhängige *second messenger* Signalkaskaden ausgelöst, die die Neurotransmitterfreisetzung und synaptische Plastizität regulieren (Buccafusco et al., 2005) und mit der Beeinflussung verschiedener Gedächtnisformen assoziiert wurden (Benfenati, 2007). Da nAChR in Aspekten synaptischer Plastizität partizipieren (Placzek et al., 2009) und sowohl  $\alpha_4\beta_2$ - und  $\alpha_7$ -nAChR-Liganden LTP im Gyrus dentatus induzierten (Hamid et al., 1997; Matsuyama et al., 2000; Matsuyama & Matsumoto, 2003), wäre es denkbar, dass die Vareniclin-induzierte verstärkte Expression von  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR die Kognition über deren Modulation synaptischer Plastizität regulierte mit der Folge der verbesserten Gedächtnisleistung.

## 4.2. Effekte von körperlichem Training

### 4.2.1. Effekt von körperlichem Training auf die Proteinregulation

Die Anwendung des ausgewählten Trainingsprotokolls basierte auf den Studien von Suvorava et al. (2010) und Dao et al. (2011), welche die Trainingseffizienz verschiedener Trainingsprotokolle in C57BL/6-Mäusen evaluierten (Suvorava et al., 2010; Dao et al., 2011). Ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal war die gesteigerte Citratsynthase-Aktivität im Soleusmuskel infolge des kurzzeitigen Trainings mit hoher Intensität im Unterschied zum freiwilligen Training (Suvorava et al., 2010; Dao et al., 2011). Da die gesteigerte Enzymaktivität im Skelettmuskel nur beim erzwungenen Training in Erscheinung trat, wurde dieses Trainingsprotokoll als effizienter im Vergleich zum freiwilligen Lauftraining beschrieben (Dao et al., 2011) und fand Anwendung in der vorliegenden Studie. Das körperliche Training über 30 min war durch eine Herzhypertrophie und ausgeprägten peripheren Muskelzuwachs (s. **Abbildung 3.33**) in den trainierten Tieren gekennzeichnet. Nach Bestätigung der Trainingseffizienz erfolgte die Proteinbestimmung der eNOS in Lysaten der Aorta und selektiven Gehirnarealen, dem präfrontalen Cortex und dem Hippocampus. Dabei fiel auf, dass trainierte Tiere eine circa 2,5fache Erhöhung der eNOS-Expression in der Aorta im Vergleich zu ruhenden Kontrolltieren aufwiesen (s. **Abbildung 3.34**). Dieser Befund stand im Einklang mit einer Fülle bereits publizierter Daten, welche eine gesteigerte arterielle eNOS-Expression infolge körperlicher Aktivität in tierexperimentellen und klinischen Untersuchungen eruierten (Kojda & Hambrecht, 2005; Dao et al., 2011). Als wesentlicher zugrunde liegender Faktor Trainings-induzierter gesteigerter eNOS-Expression wurde die Scherkraft genannt (Kojda & Hambrecht, 2005). Während körperlicher Aktivität kommt es zu einem Anstieg von kardialer Arbeitsleistung (Shen et al., 1995) und Herzfrequenz, welche wiederum den Blutfluss und die vaskuläre Scherkraft steigert (Kojda & Hambrecht, 2005). Sessa et al. zeigten erstmals eine Trainings-induzierte Erhöhung der eNOS-Proteinexpression in der Aorta von Hunden und führten diesen Effekt auf den Anstieg der koronaren Blutflussgeschwindigkeit und gesteigerten Scherkraft zurück (Sessa et al., 1994). Wurden kultivierte endotheliale Zellen laminaren Scherkräften ausgesetzt, resultierte dies ebenfalls in einer Induktion der mRNA- und Proteinexpression der eNOS (Nishida et al., 1992; Uematsu et al., 1995). Es bestanden ebenfalls Hinweise darauf, dass die Scherkraft die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies stimuliert (Laurindo et al., 1994).

Vaskulärer oxidativer Stress wurde in der Tat mit der Trainings-induzierten Hochregulation der eNOS assoziiert (Kojda & Hambrecht, 2005). Der gesteigerte myokardiale Sauerstoffverbrauch infolge körperlichen Trainings (Sessa et al., 1994) ging mit Veränderungen der oxidativ-antioxidativen Homöostase innerhalb der Zelle einher (Ji, 1999). Beispielsweise konnten Lauer et al. an einer Katalase-überexprimierenden Maus die Beteiligung von Wasserstoffperoxid an der Trainings-induzierten eNOS-Expression zeigen (Lauer et al., 2005).

Da vaskuläre oxidative Schäden mit der Pathologie von *Morbus Alzheimer* assoziiert wurden (Zhu et al., 2005; Zhu et al., 2007) und sich körperliches Training in zahlreichen tierexperimentellen und humanen Studien als nützlich für neurokognitive Funktionen erwies (Kramer et al., 2006), war eine Beteiligung der eNOS an zugrunde liegenden kognitiven Prozessen denkbar. Aus diesem Grund wurden ausgewählte Gehirnregionen für kognitive Funktionen – Präfrontaler Cortex, Hippocampus – hinsichtlich ihrer eNOS-Expression infolge körperlichen Trainings untersucht. Im Unterschied zur Aorta konnte körperliche Aktivität weder die eNOS-Expression im Cortex noch im Hippocampus (s. **Abbildung 3.35**) signifikant verändern. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre die zu geringe Zunahme der Scherkräfte in den cerebralen Blutgefäßen. Das Gehirn unterliegt einer cerebralen Autoregulation, welche einen konstanten cerebralen Blutfluss (CBF) trotz Veränderungen des Durchblutungsdrucks aufrechterhält (Schmidt et al., 2013). Im Unterschied zum peripheren Gefäßsystem bestand ein genereller Konsens darüber, dass der CBF weitgehend unbeeinflusst ist von verschiedenen Konditionen, unter anderem körperlichem Training (Ogoh & Ainslie, 2009), obgleich neuere Studien unter Anwendung moderner Techniken einen Anstieg des CBF während des Trainings zeigen konnten (Jorgensen et al., 1992; Endres et al., 2003). Endres et al. wiesen an Mäusen eine gesteigerte cerebrale Durchblutung infolge eines dreiwöchigen freiwilligen Trainingsprotokolls nach und korrelierten diesen CBF-Anstieg mit einer geringeren Infarktgröße in Mäusen, welche einer MCA (*Middle Cerebral Artery*) Okklusion unterzogen wurden (Endres et al., 2003). Da die cerebrale Durchblutung von der Intensität des Trainings abhängt (Moraine et al., 1993) und sich erzwungene und freiwillige Trainingseinheiten unterscheiden (De Bono et al., 2006), kann keine Aussage zu einer Veränderung des CBF infolge des in dieser Studie angewandten körperlichen Trainings getroffen werden. Da jedoch der Anstieg der cerebralen Blutflussgeschwindigkeit mit einer Erhöhung der Scherkraft und möglichen Folge vaskulärer Adaptationen einhergehen

würde, spricht die unveränderte eNOS-Expression im Gehirn für keinen erheblichen Anstieg des CBF. Diese Aussage ist jedoch unter dem möglichen Vorbehalt zu betrachten, dass im Gehirn vor allem mikrovaskuläre Gefäße vorherrschen und gruppeninterne Untersuchungen zeigten, dass die Regulation der eNOS in der Mikrovaskulatur (beispielsweise Skelettmuskel) geringer ausgeprägt war als die adaptiven Trainings-induzierten Veränderungen in großen Gefäßen, beispielsweise der Aorta.

Eine verstärkte Scherbeanspruchung im arteriellen Gewebe und oxidativer Stress modulieren die eNOS-Expression in der Aorta (Kojda & Hambrecht, 2005). Hingegen konnte keine veränderte Expression des  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR nachgewiesen werden (s. **Abbildung 3.36**), dessen Präsenz auf Endothelzellen (Heeschen et al., 2001; Heeschen et al., 2002) und vaskulären Muskelzellen (Shanker et al., 2006) bereits vor Jahren nachgewiesen wurde. Dies deutete darauf hin, dass die Regulation des peripheren  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR weitgehend unabhängig von körperlichem Training und der endothelialen NO-Bioverfügbarkeit verläuft. Es bestehen Hinweise darauf, dass durch Training in erster Linie die Expression potenziell atheroprotektiver Gene wie eNOS, ecSOD oder AT2-Rezeptor erhöht wurde, wohingegen potenziell atherogene vaskuläre Proteine wie die Untereinheiten der NADPH Oxidasen und AT1-Rezeptor eine verringerte Regulation erfuhren (Kojda & Hambrecht, 2005).

Vaskuläre nAChR modulieren angiogenetische Prozesse, einschließlich des Zellüberlebens sowie der Proliferation und Migration von Endothelzellen (Cooke & Ghebremariam, 2008). Insofern läge eine Beteiligung an Trainings-induzierten angiogenetischen Prozessen (Schmidt et al., 2013) nahe. Da jedoch keine Beeinflussung vaskulärer  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR durch körperliches Training beobachtet wurde, muss davon ausgegangen werden, dass die Regulation des peripheren  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR nicht zu den angiogenetischen Eigenschaften körperlichen Trainings beiträgt. Auch im Gehirn erfuhr der  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR keine Trainings-induzierte Regulation (s. **Abbildung 3.37**). Dies war insofern erklärbar, als dass der zentrale nAChR kognitive Prozesse via cholinergischer Modulation induziert (Ochoa & Lasalde-Dominicci, 2007), die prokognitiven Effekte körperlichen Trainings hingegen über nAChR-unabhängige Signalwege vermittelt werden, beispielsweise Neurogenese (van Praag, 2009). Körperliches Training wurde in vorangegangenen Studien ebenfalls mit einer Hochregulation von Neutrophilen und insbesondere BDNF (Adlard et al., 2004; O'Callaghan et al., 2007; Gomez-Pinilla et al., 2008) assoziiert. Im Gegensatz zu diesen Studienbefunden konnte in unserer Untersuchung keine signifikante Erhöhung der BDNF-

Expression detektiert werden, weder im präfrontalen Cortex noch im Hippocampus (s. **Abbildung 3.38**). Ein möglicher Erklärungsansatz für die Diskrepanz der Ergebnisse wäre die Anwendung unterschiedlicher Trainingsprotokolle. Variationen der Länge und Intensität des Trainings wurden bereits für abweichende Studienbefunde zu publizierten Daten verantwortlich gemacht (O'Callaghan et al., 2007). In unserer Studie wurde ein erzwungenes Training durchgeführt, welches in vorangegangenen Studien als effizienter beurteilt wurde als freiwillige Trainingseinheiten (Dao et al., 2011) und die Einhaltung konstanter Laufgeschwindigkeit und -distanzen garantierte (De Bono et al., 2006). Vanyman et al. demonstrierten beispielsweise eine erhöhte mRNA-Expression des BDNF im Hippocampus infolge eines einwöchigen, freiwilligen Trainingsregimes (Vaynman et al., 2004b). Dabei konnte eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression des BDNF bereits nach wenigen Tagen oder einer Woche detektiert werden (Neeper et al., 1996; Gomez-Pinilla et al., 2008). Messungen der mRNA-Spiegel erlauben jedoch keine Aussage zum funktionellen Protein. Adlard et al. bestimmten die Proteinexpression des BDNF und konnten eine Hochregulation des Proteins infolge freiwilligen Trainings erst nach 28 Tagen detektieren (Adlard et al., 2004). Insofern wäre es denkbar, dass Trainings-induzierte Auswirkungen auf die BDNF-Expression bei Verlängerung der Trainingsdauer einer signifikanten Veränderung unterlegen wären. Aus diesem Grund sollte in nachfolgenden Studien die Trainingsdauer verlängert und eine Messung der mRNA-Expression des BDNF zusätzlich erfolgen. Zusammenfassend ließ sich auf Basis der oben dargestellten Studienbefunde kein zentraler Beitrag des angewandten erzwungenen Trainings auf molekularer Ebene postulieren.

### **4.2.2. Effekt von körperlichem Training auf die Objektwiedererkennung**

Körperliches Training führte zu einer unveränderten Objekterkennung, da trainierte Tiere keine Wiederherstellung derselben nach Veränderung des Retentionsintervall demonstrierten (s. **Abbildung 3.39**). Dabei war das Ausbleiben des Trainings-induzierten Effekts unabhängig von der endogenen NO-Bioverfügbarkeit, da sowohl C57BL/6-Tiere (s. **Abbildung 3.39**) als auch trainierte eNOS<sup>-/-</sup>-Tiere, die keine endothelständige NOS exprimierten (s. **Abbildung 3.43**), keinen Effekt auf die Objektwiedererkennung demonstrierten. Hingegen bestanden Hinweise in der Literatur, dass körperliches Training kognitive Funktionen verbessert (Fordyce & Wehner, 1993; Kramer et al., 1999). Viele

Studien legten dabei ihr Augenmerk auf den Hippocampus und evaluierten anhand Hippocampus-abhängiger Aufgabenstellungen dessen Beitrag auf Trainings-induzierte kognitive Effekte (Kramer et al., 2006). Insofern wäre es möglich, dass trainierte Tiere in überwiegend Hippocampus-abhängigen Aufgabenstellungen, beispielsweise dem Morris Wasserlabyrinth, eine verbesserte kognitive Leistung abrufen können. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass die Objektwiedererkennung zwar in erster Linie über corticale Strukturen, insbesondere den perirhinalen Cortex vermittelt wurde (Barker et al., 2007), ein Beitrag des Hippocampus von anderen Autoren jedoch ebenfalls postuliert wurde (Broadbent et al., 2004). Zudem stützte das Ausbleiben der Trainings-induzierten Kompensation des Scopolamin-induzierten Defizits bei Objektwiedererkennung (s. **Abbildung 3.40**) – trotz zentraler Wirkung von Scopolamin, erkennbar an dem hyperlokomotorischen Effekt (s. **Abbildung 3.41**) - den fehlenden Trainings-induzierten kognitiven Effekt. Dieser Befund war nicht verwunderlich, da die Aufhebung der Scopolamin-induzierten cholinergen Blockade und Trainings-induzierte Effekte via gesteigerter Durchblutung und Freisetzung von Wachstumsfaktoren unterschiedliche prokognitive Mechanismen unter Ausnutzung abweichender Signalwege darstellen.

Es erschien naheliegend, dass der fehlende Effekt auf die neuronale Funktion Folge der unveränderten BDNF- und eNOS-Regulation war. Untersuchungen der Vergangenheit wiesen einer veränderten BDNF-Expression bei kognitiven Prozessen eine Schlüsselrolle zu (Vaynman et al., 2004b). Für BDNF wurden Effekte auf die synaptische Plastizität (Cotman et al., 2007) und Lernen und Gedächtnis (Vaynman et al., 2004b) postuliert. Eine verbesserte Hirndurchblutung – über die Steigerung des CBV (cerebrales Blutvolumen) und CBF – soll kognitive Eigenschaften verbessern (Schmidt et al., 2013). Das Ausbleiben der Objektwiedererkennung der trainierten Tiere ist daher im Einklang mit der fehlenden BDNF- und eNOS-Regulation in den zentralen Schaltstellen für Kognition. Es stellte sich daher die Frage, welche Ursache der unveränderten Proteinexpression infolge körperlichen Trainings zugrunde lag. In unserer Studie wurde ein erzwungenes Training durchgeführt, welches in vorangegangenen Studien als effizienter beurteilt wurde als freiwillige Trainingseinheiten (Dao et al., 2011), jedoch wurden die Versuchstiere einem starken psychischen Stress ausgesetzt (De Bono et al., 2006). Es waren O'Callaghan et al., die für das erzwungene Training eine verbesserte Vergleichbarkeit zu humanen Trainingsprotokollen postulierten, aber auch die mögliche Auslöschung prokognitiver Effekte anderer Trainingsprotokolle durch angestiegene Stressniveaus (O'Callaghan et al.,

2007). Die Autoren konnten nach Durchführung eines einwöchigen, erzwungenen Trainings keine verbesserte räumliche Lernleistung von Ratten im Morris Wasserlabyrinth zeigen (O'Callaghan et al., 2007). Kim et al. demonstrierten unterschiedliche Effekte auf die Trainings-induzierte Zellproliferation im Hippocampus unter Anwendung verschiedener Trainingsmethoden. Mit zunehmender Intensität des körperlichen Trainings war eine Abnahme der Produktion neuer Zellen im Gyrus dentatus verbunden (Kim et al., 2003), während vorangegangene Studien eine gesteigerte Zellproduktion mit synaptischer Plastizität und Lernen assoziierten (van Praag et al., 1999). Die Autoren bezeichneten intensives Training als eine Form von Stress, die eine Sekretion von Glucocorticoiden mit der Folge einer Inhibition der Trainings-induzierten Zellproliferation verursachte (Kim et al., 2003). Diese Studien evaluierten somit einen Effekt der Trainingsintensität sowohl auf molekularer (Kim et al., 2003) als auch funktioneller Ebene (O'Callaghan et al., 2007). Es wäre möglich, dass das in unserer Studie angewandte erzwungene Trainingsprotokoll eine zu hohe Intensität besaß für die Generierung prokognitiver Effekte. Zur Demonstration Trainings-induzierter Effekte waren jedoch nicht nur Länge und Intensität des durchgeführten Trainings entscheidend, sondern ebenfalls die untersuchte Tierspezies. Ein Großteil der Studien testete die trainingsabhängige kognitive Leistung in Verhaltensexperimenten an Ratten (Anderson et al., 2000; Vaynman et al., 2004b). Ratten unterscheiden sich von den in unserer Studie angewandten C57BL/6-Mäusen hinsichtlich ihrer Explorationsneigung gegenüber neuartigen Objekten (Dere et al., 2007) und ihrer Fähigkeit, Objektinformationen über einen längeren Zeitraum zu speichern (Bertina-Anglade et al., 2006). Aus diesem Grund sollte ein Vergleich zwischen Studienbefunden, die an Ratten und Mäusen erhoben wurden, nur eingeschränkt erfolgen.

### **4.3. Effekte von endogenem NO**

Es bestanden Hinweise darauf, dass eine Serin-1177-Phosphorylierung der eNOS sowie die Dephosphorylierung von Threonin-495 durch VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) induziert werden (Mount et al., 2007). Zudem war die Regulation der BDNF-Freisetzung durch VEGF bekannt (Carmeliet, 2003). Insofern war eine koordinative Interaktion zwischen NO und BDNF denkbar. In der vorliegenden Studie wurde die Fragestellung untersucht, ob endogenes NO die BDNF-Expression reguliert. Hierfür bedienten wir uns der transgenen Knockout-Linie eNOS<sup>-/-</sup>, welche keine endothelständige

eNOS exprimierte. Die Evaluation der BDNF-Regulation erfolgte im Cortex- und Hippocampusgewebe von Wildtyp- und eNOS<sup>-/-</sup>-Mäusen. Im Wesentlichen deuteten die Ergebnisse darauf hin, dass der Verlust von endothelialem NO zu keiner Veränderung der BDNF-Expression führte, weder im präfrontalen Cortex, noch im Hippocampus (s. **Abbildung 3.44**). Die BDNF-Expression war damit weitgehend unabhängig von einer Regulation durch die eNOS. Dieses Ergebnis stand in Kontrast zu den von Canossa et al. (2002) vorgestellten Studienbefunden, welche infolge pharmakologischer Hemmung von NOS durch L-NAME (L-Arginin-Methylester), einem kompetitiven NOS-Inhibitor aufgrund dessen Ähnlichkeit zum biologischen Substrat des Enzyms (Connors et al., 2006), eine gesteigerte BDNF-Sekretion in kultivierten hippocampalen Neuronen demonstrierten (Canossa et al., 2002). Unser Studienbefund (s. **Abbildung 3.44**) ähnelte eher dem Befund von Chen et al. (2005). Die Autoren untersuchten den Effekt der eNOS auf Angiogenese, Neurogenese, Neutrophin-Expression und neurologische Funktion in einem Maus-Schlaganfallmodell (Chen et al., 2005). Chen et al. (2005) kamen zu dem Ergebnis, dass in den eNOS<sup>-/-</sup>-Mäusen eine signifikant geringere BDNF-Expression nach Okklusion der rechten Cerebralarterie im Vergleich zum Wildtyp vorlag (Chen et al., 2005). Sie erklärten ihren abweichenden Studienbefund zu Canossa et al., indem sie auf deren Untersuchung *in vitro* an embryonalen Zellen verwiesen, im Unterschied zu ihrer Studie *in vivo* an adultem Gehirngewebe (Chen et al., 2005). Obgleich in unserer Studie die eNOS<sup>-/-</sup>-Mäuse eine numerisch geringere BDNF-Expression im Vergleich zum Wildtyp demonstrierten (s. **Abbildung 3.44**), fielen die statistischen Vergleiche nicht signifikant verschieden aus. Aus diesem Grund sollte in nachfolgenden Untersuchungen die Versuchstieranzahl erhöht und das Ergebnis bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung des abweichenden Studienbefunds zu Chen et al. könnte ebenfalls die Untersuchung an gesundem (s. **Abbildung 3.44**) und ischämischem Gehirngewebe (Chen et al., 2005) darstellen.

Zur Untersuchung eines neuronalen Effekts von endothelialem NO wurden zudem transgene Mauslinien, eNOS<sup>-/-</sup>- und eNOS-überexprimierende eNOS<sup>+/+</sup>-Mäuse, hinsichtlich ihres Verhaltens in der Objekterkennung getestet. Es fiel auf, dass weder der Verlust noch die gesteigerte Produktion von endothelialem NO zu einer Verbesserung der Objekterkennung führte. eNOS<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten eine Objektwiedererkennung nach 50 min, die nach Veränderung des Retentionsintervalls auf 3 h oder 10 min verloren ging (s. **Abbildung 3.45**). Diese Befunde bestätigten den Effekt einer unveränderten BDNF-Expression durch Reduktion der NO-Bioverfügbarkeit im Knockout-Tier, da das Verhalten

der eNOS<sup>-/-</sup>-Mäuse dem Muster von C57BL/6-Mäusen in der Objekterkennung entsprach und Effekte von BDNF auf die neuronale Funktion hinlänglich bekannt waren (Vaynman et al., 2004b; Cotman et al., 2007). Diese Daten waren im Einklang mit den Studienbefunden von Dere et al. (2001) welche eNOS<sup>-/-</sup>-Tiere mit transgen unveränderten Geschwistertieren verglichen und keine Verbesserung der kognitiven Leistung hinsichtlich Akquisition oder Langzeitretention im räumlichen Labyrinth demonstrierten (Dere et al., 2001). Auch die gesteigerte NO-Produktion in eNOS-überexprimierenden Tieren führte zu keiner Verbesserung der Objektwiedererkennung nach Veränderung des Verzögerungsintervalls (s. **Abbildung 3.45**). Zusammenfassend ließ sich auf Basis der oben dargestellten Studienbefunde schließen, dass endogenes, endotheliales NO weder einen Effekt auf die BDNF-Expression ausübte noch zu veränderten Eigenschaften in der Objekterkennung führte. Aus diesem Grund muss davon ausgegangen werden, dass endotheliales NO keinen Einfluss auf die neuronale Funktion - Objektwiedererkennung - ausübte.

## 5. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Bewertung von pharmakologischen und nicht-pharmakologischen Strategien zur Behandlung von Demenzformen, beispielsweise *Morbus Alzheimer*. Hierfür wurden der cholinerge Ligand Vareniclin und eine nicht-pharmakologische Intervention – körperliches Training – in funktionellen und molekularen Untersuchungen studiert.

Es gilt als wissenschaftlich gesichert, dass cholinerge Signalwege an kognitiven Prozessen, die das Lernen und Gedächtnis betreffen, beteiligt sind. Dabei kommt der cholinergen Signaltransduktion via nikotinischer Acetylcholinrezeptoren des Subtyps  $\alpha_4\beta_2$  eine Schlüsselrolle zu. Vareniclin besitzt aktuell eine Zulassung in Europa (Champix<sup>®</sup>) und USA (Chantix<sup>®</sup>) zur Behandlung der Nikotinabhängigkeit. Mögliche prokognitive Effekte wurden der Substanz aufgrund ihres Partialagonismus an  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR zugewiesen. Prokognitive Effekte wurden ebenfalls infolge körperlicher Aktivität postuliert. Als mögliche Ursachen Trainings-induzierter kognitiver Leistungsfähigkeit wurden eine gesteigerte Neurogenese, eine verbesserte Hirndurchblutung und die Regulation von Wachstumsfaktoren genannt. In dieser Studie erfolgte die Beurteilung des kognitiven Effekts von Vareniclin und körperlichem Training anhand zweier Modelle zur Erfassung der Objekterkennung *in vivo*. Zugrunde liegende mögliche Mechanismen wurden mittels Untersuchungen auf Protein- und mRNA-Ebene *in vivo* und *in vitro* eruiert.

Die Applikation des Partialagonisten an  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR demonstrierte keine *per se* Verbesserung der Objektwiedererkennung und des räumlichen Objektgedächtnisses in behandelten C57BL/6-Mäusen. Hingegen konnte durch die Testsubstanz eine Normalisierung auf Kontrollebene bei Anwendung eines mit kognitiven Dysfunktionen einhergehenden pharmakologischen Defizitmodells beobachtet werden. Bislang existierten keine Untersuchungen zur Regulationsfähigkeit spezifischer Untereinheiten des  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR durch Vareniclin. In dieser Studie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die partielle Aufhebung des Scopolamin-induzierten kognitiven Defizits von einer Vareniclin-vermittelten Hochregulation der Untereinheiten des  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR in Neocortex und Hippocampus begleitet war. Diese war posttranskriptionell gesteuert. Untersuchungen *in vivo* dienten der Beurteilung der biologischen Relevanz der molekularen und funktionellen Effekte von Vareniclin. *In vitro* Untersuchungen an neuronalen und endothelialen

Zelllinien stützten die *in vivo* ermittelten Daten einer selektiven Hochregulation von  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR ohne Beteiligung der Transkriptionsebene.

Hingegen konnte infolge körperlicher Aktivität kein Einfluss auf die Objektwiedererkennung verzeichnet werden, weder bei Verlängerung des Retentionsintervalls noch infolge der Anwendung eines Scopolamin-induzierten Defizitmodells. Trainings-induzierte Veränderungen der Proteinregulation konnten für die eNOS in der Aorta detektiert werden. Hingegen war das Ausbleiben zentraler molekularer Veränderungen in Übereinstimmung mit dem fehlenden Trainings-induzierten Effekt auf die Objektwiedererkennung, welche sich ebenfalls unabhängig von der endothelialen NO-Bioverfügbarkeit zeigte.

Auf Basis der oben dargestellten Studienbefunde kann davon ausgegangen werden, dass erzwungenes körperliches Training keinen Effekt auf die Objektwiedererkennung ausübte. Die postulierte Signalverstärkung über hochregulierte  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR als mögliche Ursache des promnestischen Effekts von Vareniclin weist dieser Substanz hingegen eine potenzielle Rolle bei der Behandlung von dementiellen Erkrankungen zu.

## Summary

The primary objective of this work was the evaluation of pharmacological and non-pharmacological strategies for the treatment of dementia, such as Alzheimer's disease. Thus the cholinergic ligand varenicline and a non-pharmacological intervention - physical training - were studied in functional and molecular studies.

It is established that cholinergic mechanisms are involved in cognitive processes that affect learning and memory. Cholinergic neurotransmission via  $\alpha_4\beta_2$  subtypes of nicotinic acetylcholine receptors is one important pathway in mediating cognitive processes. Varenicline is currently approved in Europe (Champix<sup>®</sup>) and USA (Chantix<sup>®</sup>) for the treatment of nicotine dependence. Possible procognitive effects of the substance have been attributed due to its partial agonism at  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR. Procognitive effects have also been postulated as a result of physical activity. Enhanced neurogenesis, improved cerebral blood flow and the regulation of growth factors have been proposed as possible causes of exercise-induced cognitive performance. This study assessed the cognitive effects of varenicline and physical training by using two models of the object recognition task *in vivo*. Possible underlying mechanisms were investigated by tests at protein and mRNA levels *in vivo* and *in vitro*.

The application of the partial agonist at  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR did not demonstrate an improved memory performance of C57BL/6 mice *per se* in object recognition and object-place recognition tasks. However, the test substance reversed the pharmacological-induced cognitive dysfunction up to control level. So far, there have been no studies regarding the regulation of specific subunits of nAChR by varenicline. In this study it was shown that the partial reversal of the anticholinergic-induced cognitive deficit was accompanied by a varenicline-induced upregulation of the subunits of the  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR in neocortex and hippocampus. This was post-transcriptionally controlled. *In vivo* tests were used to assess the biological relevance of the molecular and functional effects of varenicline. *In vitro* data which were generated at neuronal and endothelial cell cultures supported the molecular study findings in experimental animals without changes in transcription levels.

In contrast, no effect on the object recognition was observed as a result of physical activity, neither in use of an elongated retention interval nor a pharmacological-induced cognitive deficit model. Exercise-induced changes in protein regulation could be detected for eNOS in the aorta. In accordance with the lack of exercise-induced effect at the molecular level in

the central nervous system, exercise did not affect object recognition, regardless of the endothelial NO bioavailability.

Based on the study findings presented above, it can be assumed that forced exercise training exerted no benefit on object recognition. The improved signal transduction via upregulated  $\alpha_4\beta_2$ -nAChR as a possible underlying mechanism of varenicline's promnestic effect, however, may suggest a potential role of varenicline in the treatment of dementia.

## 6. Literaturverzeichnis

Abbott, R. D., White, L. R., Ross, G. W., Masaki, K. H., Curb, J. D., & Petrovitch, H. (2004). Walking and dementia in physically capable elderly men. *JAMA*, 292, 1447-1453.

Abdulla, F. A., Bradbury, E., Calaminici, M. R., Lippiello, P. M., Wonnacott, S., Gray, J. A., & Sinden, J. D. (1996). Relationship between up-regulation of nicotine binding sites in rat brain and delayed cognitive enhancement observed after chronic or acute nicotinic receptor stimulation. *Psychopharmacology (Berl)*, 124, 323-331.

Adlard, P. A., Perreau, V. M., Engesser-Cesar, C., & Cotman, C. W. (2004). The timecourse of induction of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the rat hippocampus following voluntary exercise. *Neurosci.Lett.*, 363, 43-48.

Adlard, P. A., Perreau, V. M., Pop, V., & Cotman, C. W. (2005). Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J.Neurosci.*, 25, 4217-4221.

Aggleton, J. P., Keen, S., Warburton, E. C., & Bussey, T. J. (1997). Extensive cytotoxic lesions involving both the rhinal cortices and area TE impair recognition but spare spatial alternation in the rat. *Brain Res.Bull.*, 43, 279-287.

Ahlskog, J. E., Geda, Y. E., Graff-Radford, N. R., & Petersen, R. C. (2011). Physical exercise as a preventive or disease-modifying treatment of dementia and brain aging. *Mayo Clin.Proc.*, 86, 876-884.

Aid, T., Kazantseva, A., Piiroo, M., Palm, K., & Timmusk, T. (2007). Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J.Neurosci.Res.*, 85, 525-535.

Anand, R., Conroy, W. G., Schoepfer, R., Whiting, P., & Lindstrom, J. (1991). Neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes have a pentameric quaternary structure. *J.Biol.Chem.*, 266, 11192-11198.

Anderson, B. J., Rapp, D. N., Baek, D. H., McCloskey, D. P., Coburn-Litvak, P. S., & Robinson, J. K. (2000). Exercise influences spatial learning in the radial arm maze. *Physiol Behav.*, 70, 425-429.

Arredondo, J., Chernyavsky, A. I., Jolkovsky, D. L., Pinkerton, K. E., & Grando, S. A. (2008). Receptor-mediated tobacco toxicity: acceleration of sequential expression of alpha5 and alpha7 nicotinic receptor subunits in oral keratinocytes exposed to cigarette smoke. *FASEB J.*, 22, 1356-1368.

Atochin, D. N., Wang, A., Liu, V. W., Critchlow, J. D., Dantas, A. P., Looft-Wilson, R., Murata, T., Salomone, S., Shin, H. K., Ayata, C., Moskowitz, M. A., Michel, T., Sessa, W. C., & Huang, P. L. (2007). The phosphorylation state of eNOS modulates vascular reactivity and outcome of cerebral ischemia in vivo. *J.Clin.Invest*, 117, 1961-1967.

Aubin, H. J., Bobak, A., Britton, J. R., Oncken, C., Billing, C. B., Jr., Gong, J., Williams, K. E., & Reeves, K. R. (2008). Varenicline versus transdermal nicotine patch for smoking cessation: results from a randomised open-label trial. *Thorax*, 63, 717-724.

- Autry, A. E. & Monteggia, L. M. (2012). Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol.Rev.*, 64, 238-258.
- Bagamasbad, P., Ziera, T., Borden, S. A., Bonett, R. M., Rozeboom, A. M., Seasholtz, A., & Denver, R. J. (2012). Molecular basis for glucocorticoid induction of the Kruppel-like factor 9 gene in hippocampal neurons. *Endocrinology*, 153, 5334-5345.
- Barker, G. R., Bird, F., Alexander, V., & Warburton, E. C. (2007). Recognition memory for objects, place, and temporal order: a disconnection analysis of the role of the medial prefrontal cortex and perirhinal cortex. *J.Neurosci.*, 27, 2948-2957.
- Barker, G. R. & Warburton, E. C. (2009). Critical role of the cholinergic system for object-in-place associative recognition memory. *Learn.Mem.*, 16, 8-11.
- Bartko, S. J., Winters, B. D., Cowell, R. A., Saksida, L. M., & Bussey, T. J. (2007). Perceptual functions of perirhinal cortex in rats: zero-delay object recognition and simultaneous oddity discriminations. *J.Neurosci.*, 27, 2548-2559.
- Bartolini, L., Casamenti, F., & Pepeu, G. (1996). Aniracetam restores object recognition impaired by age, scopolamine, and nucleus basalis lesions. *Pharmacol.Biochem.Behav.*, 53, 277-283.
- Bartus, R. T., Dean, R. L., III, Beer, B., & Lippa, A. S. (1982). The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*, 217, 408-414.
- Bastaki, M., Nelli, E. E., Dell'Era, P., Rusnati, M., Molinari-Tosatti, M. P., Parolini, S., Auerbach, R., Ruco, L. P., Possati, L., & Presta, M. (1997). Basic fibroblast growth factor-induced angiogenic phenotype in mouse endothelium. A study of aortic and microvascular endothelial cell lines. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 17, 454-464.
- Bekris, L. M., Yu, C. E., Bird, T. D., & Tsuang, D. W. (2010). Genetics of Alzheimer disease. *J.Geriatr.Psychiatry Neurol.*, 23, 213-227.
- Bencherif, M., Fowler, K., Lukas, R. J., & Lippiello, P. M. (1995). Mechanisms of up-regulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors in clonal cell lines and primary cultures of fetal rat brain. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 275, 987-994.
- Benfenati, F. (2007). Synaptic plasticity and the neurobiology of learning and memory. *Acta Biomed.*, 78 Suppl 1, 58-66.
- Benowitz, N. L. (2010). Nicotine addiction. *N.Engl.J.Med.*, 362, 2295-2303.
- Benwell, M. E. & Balfour, D. J. (1992). The effects of acute and repeated nicotine treatment on nucleus accumbens dopamine and locomotor activity. *Br.J.Pharmacol.*, 105, 849-856.
- Benwell, M. E., Balfour, D. J., & Anderson, J. M. (1988). Evidence that tobacco smoking increases the density of (-)-[3H]nicotine binding sites in human brain. *J.Neurochem.*, 50, 1243-1247.

- Berchtold, N. C., Chinn, G., Chou, M., Kessler, J. P., & Cotman, C. W. (2005). Exercise primes a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus. *Neuroscience*, 133, 853-861.
- Bertaina-Anglade, V., Enjuanes, E., Morillon, D., & Drieu la Rochelle, C. (2006). The object recognition task in rats and mice: a simple and rapid model in safety pharmacology to detect amnesic properties of a new chemical entity. *J.Pharmacol.Toxicol.Methods*, 54, 99-105.
- Bertrand, F., Lehmann, O., Galani, R., Lazarus, C., Jeltsch, H., & Cassel, J. C. (2001). Effects of MDL 73005 on water-maze performances and locomotor activity in scopolamine-treated rats. *Pharmacol.Biochem.Behav.*, 68, 647-660.
- Black, J. E., Isaacs, K. R., Anderson, B. J., Alcantara, A. A., & Greenough, W. T. (1990). Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis, in cerebellar cortex of adult rats. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 87, 5568-5572.
- Bolden, C., Cusack, B., & Richelson, E. (1992). Antagonism by antimuscarinic and neuroleptic compounds at the five cloned human muscarinic cholinergic receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 260, 576-580.
- Bontempi, B., Whelan, K. T., Risbrough, V. B., Lloyd, G. K., & Menzaghi, F. (2003). Cognitive enhancing properties and tolerability of cholinergic agents in mice: a comparative study of nicotine, donepezil, and SIB-1553A, a subtype-selective ligand for nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropsychopharmacology*, 28, 1235-1246.
- Botton, P. H., Costa, M. S., Ardais, A. P., Mioranza, S., Souza, D. O., da Rocha, J. B., & Porciuncula, L. O. (2010). Caffeine prevents disruption of memory consolidation in the inhibitory avoidance and novel object recognition tasks by scopolamine in adult mice. *Behav.Brain Res.*, 214, 254-259.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.*, 72, 248-254.
- Briggs, C. A., Anderson, D. J., Brioni, J. D., Buccafusco, J. J., Buckley, M. J., Campbell, J. E., Decker, M. W., Donnelly-Roberts, D., Elliott, R. L., Gopalakrishnan, M., Holladay, M. W., Hui, Y. H., Jackson, W. J., Kim, D. J., Marsh, K. C., O'Neill, A., Prendergast, M. A., Ryther, K. B., Sullivan, J. P., & Arneric, S. P. (1997). Functional characterization of the novel neuronal nicotinic acetylcholine receptor ligand GTS-21 in vitro and in vivo. *Pharmacol.Biochem.Behav.*, 57, 231-241.
- Broad, L. M., Zwart, R., Pearson, K. H., Lee, M., Wallace, L., McPhie, G. I., Emkey, R., Hollinshead, S. P., Dell, C. P., Baker, S. R., & Sher, E. (2006). Identification and pharmacological profile of a new class of selective nicotinic acetylcholine receptor potentiators. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 318, 1108-1117.
- Broadbent, N. J., Squire, L. R., & Clark, R. E. (2004). Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 101, 14515-14520.

- Buccafusco, J. J., Letchworth, S. R., Bencherif, M., & Lippiello, P. M. (2005). Long-lasting cognitive improvement with nicotinic receptor agonists: mechanisms of pharmacokinetic-pharmacodynamic discordance. *Trends Pharmacol.Sci.*, 26, 352-360.
- Buckingham, S. D., Jones, A. K., Brown, L. A., & Sattelle, D. B. (2009). Nicotinic acetylcholine receptor signalling: roles in Alzheimer's disease and amyloid neuroprotection. *Pharmacol.Rev.*, 61, 39-61.
- Buckley, M. J. & Gaffan, D. (1998). Perirhinal cortex ablation impairs configural learning and paired-associate learning equally. *Neuropsychologia*, 36, 535-546.
- Burdette, J. H., Laurienti, P. J., Espeland, M. A., Morgan, A., Telesford, Q., Vechlekar, C. D., Hayasaka, S., Jennings, J. M., Katula, J. A., Kraft, R. A., & Rejeski, W. J. (2010). Using network science to evaluate exercise-associated brain changes in older adults. *Front Aging Neurosci.*, 2, 23.
- Burghaus, L., Schutz, U., Krempel, U., de Vos, R. A., Jansen Steur, E. N., Wevers, A., Lindstrom, J., & Schroder, H. (2000). Quantitative assessment of nicotinic acetylcholine receptor proteins in the cerebral cortex of Alzheimer patients. *Brain Res.Mol.Brain Res.*, 76, 385-388.
- Cahill, K., Stead, L. F., & Lancaster, T. (2012). Nicotine receptor partial agonists for smoking cessation. *Cochrane.Database.Syst.Rev.*, 4, CD006103.
- Canossa, M., Giordano, E., Cappello, S., Guarnieri, C., & Ferri, S. (2002). Nitric oxide down-regulates brain-derived neurotrophic factor secretion in cultured hippocampal neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 99, 3282-3287.
- Carmeliet, P. (2003). Blood vessels and nerves: common signals, pathways and diseases. *Nat.Rev.Genet.*, 4, 710-720.
- Carrozzi, L., Pistelli, F., & Viegi, G. (2008). Pharmacotherapy for smoking cessation. *Ther.Adv.Respir.Dis.*, 2, 301-317.
- Carter, D. B., Dunn, E., McKinley, D. D., Stratman, N. C., Boyle, T. P., Kuiper, S. L., Oostveen, J. A., Weaver, R. J., Boller, J. A., & Gurney, M. E. (2001). Human apolipoprotein E4 accelerates beta-amyloid deposition in APPsw transgenic mouse brain. *Ann.Neurol.*, 50, 468-475.
- Castellani, R. J., Rolston, R. K., & Smith, M. A. (2010). Alzheimer disease. *Dis.Mon.*, 56, 484-546.
- Chen, J., Zacharek, A., Zhang, C., Jiang, H., Li, Y., Roberts, C., Lu, M., Kapke, A., & Chopp, M. (2005). Endothelial nitric oxide synthase regulates brain-derived neurotrophic factor expression and neurogenesis after stroke in mice. *J.Neurosci.*, 25, 2366-2375.
- Chen, K. S., Masliah, E., Mallory, M., & Gage, F. H. (1995). Synaptic loss in cognitively impaired aged rats is ameliorated by chronic human nerve growth factor infusion. *Neuroscience*, 68, 19-27.

- Chintoh, A., Fulton, J., Koziel, N., Aziz, M., Sud, M., & Yeomans, J. S. (2003). Role of cholinergic receptors in locomotion induced by scopolamine and oxotremorine-M. *Pharmacol.Biochem.Behav.*, 76, 53-61.
- Christensen, R., Marcussen, A. B., Wortwein, G., Knudsen, G. M., & Aznar, S. (2008). Abeta(1-42) injection causes memory impairment, lowered cortical and serum BDNF levels, and decreased hippocampal 5-HT(2A) levels. *Exp.Neurol.*, 210, 164-171.
- Christianson, J. C. & Green, W. N. (2004). Regulation of nicotinic receptor expression by the ubiquitin-proteasome system. *EMBO J.*, 23, 4156-4165.
- Coe, J. W., Brooks, P. R., Vetelino, M. G., Wirtz, M. C., Arnold, E. P., Huang, J., Sands, S. B., Davis, T. I., Lebel, L. A., Fox, C. B., Shrikhande, A., Heym, J. H., Schaeffer, E., Rollema, H., Lu, Y., Mansbach, R. S., Chambers, L. K., Rovetti, C. C., Schulz, D. W., Tingley, F. D., III, & O'Neill, B. T. (2005). Varenicline: an alpha4beta2 nicotinic receptor partial agonist for smoking cessation. *J.Med.Chem.*, 48, 3474-3477.
- Colcombe, S. & Kramer, A. F. (2003). Fitness effects on the cognitive function of older adults: a meta-analytic study. *Psychol.Sci.*, 14, 125-130.
- Colcombe, S. J., Erickson, K. I., Scalf, P. E., Kim, J. S., Prakash, R., McAuley, E., Elavsky, S., Marquez, D. X., Hu, L., & Kramer, A. F. (2006). Aerobic exercise training increases brain volume in aging humans. *J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.*, 61, 1166-1170.
- Collins, A. C., Luo, Y., Selvaag, S., & Marks, M. J. (1994). Sensitivity to nicotine and brain nicotinic receptors are altered by chronic nicotine and mecamylamine infusion. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 271, 125-133.
- Connors, W., Whitebeck, C., Chicester, P., Legget, R., Lin, A. D., Johnson, A., Kogan, B., Levin, R., & Mannikarottu, A. (2006). L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor, diminishes oxidative damage in urinary bladder partial outlet obstruction. *Am.J.Physiol Renal Physiol*, 290, F357-F363.
- Cooke, J. P. & Ghebremariam, Y. T. (2008). Endothelial nicotinic acetylcholine receptors and angiogenesis. *Trends Cardiovasc.Med.*, 18, 247-253.
- Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., Roses, A. D., Haines, J. L., & Pericak-Vance, M. A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, 261, 921-923.
- Cordero-Erausquin, M., Marubio, L. M., Klink, R., & Changeux, J. P. (2000). Nicotinic receptor function: new perspectives from knockout mice. *Trends Pharmacol.Sci.*, 21, 211-217.
- Cotman, C. W., Berchtold, N. C., & Christie, L. A. (2007). Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci.*, 30, 464-472.
- Court, J., Martin-Ruiz, C., Piggott, M., Spurden, D., Griffiths, M., & Perry, E. (2001). Nicotinic receptor abnormalities in Alzheimer's disease. *Biol.Psychiatry*, 49, 175-184.

- Coyle, J. T., Geerts, H., Sorra, K., & Amatniek, J. (2007). Beyond in vitro data: a review of in vivo evidence regarding the allosteric potentiating effect of galantamine on nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's neuropathology. *J.Alzheimers.Dis.*, 11, 491-507.
- Creer, D. J., Romberg, C., Saksida, L. M., van Praag, H., & Bussey, T. J. (2010). Running enhances spatial pattern separation in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 107, 2367-2372.
- Creese, I. & Sibley, D. R. (1981). Receptor adaptations to centrally acting drugs. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.*, 21, 357-391.
- Crunelle, C. L., Miller, M. L., Booij, J., & van den Brink, W. (2010). The nicotinic acetylcholine receptor partial agonist varenicline and the treatment of drug dependence: a review. *Eur.Neuropsychopharmacol.*, 20, 69-79.
- Cummings, J. L. (2004). Alzheimer's disease. *N.Engl.J.Med.*, 351, 56-67.
- Cummings, J. L. & Benson, D. F. (1987). The role of the nucleus basalis of Meynert in dementia: review and reconsideration. *Alzheimer Dis.Assoc.Disord.*, 1, 128-155.
- Dani, J. A. & Bertrand, D. (2007). Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.*, 47, 699-729.
- Dani, J. A., Radcliffe, K. A., & Pidoplichko, V. I. (2000). Variations in desensitization of nicotinic acetylcholine receptors from hippocampus and midbrain dopamine areas. *Eur.J.Pharmacol.*, 393, 31-38.
- Dao, V. T., Floeren, M., Kumpf, S., Both, C., Peter, B., Balz, V., Suvorava, T., & Kojda, G. (2011). Catalase activity prevents exercise-induced up-regulation of vasoprotective proteins in venous tissue. *J.Cell Mol.Med.*, 15, 2326-2334.
- Darsow, T., Booker, T. K., Pina-Crespo, J. C., & Heinemann, S. F. (2005). Exocytic trafficking is required for nicotine-induced up-regulation of alpha 4 beta 2 nicotinic acetylcholine receptors. *J.Biol.Chem.*, 280, 18311-18320.
- Davies, P. & Feisullin, S. (1981). Postmortem stability of alpha-bungarotoxin binding sites in mouse and human brain. *Brain Res.*, 216, 449-454.
- Davila-Garcia, M. I., Houghtling, R. A., Qasba, S. S., & Kellar, K. J. (1999). Nicotinic receptor binding sites in rat primary neuronal cells in culture: characterization and their regulation by chronic nicotine. *Brain Res.Mol.Brain Res.*, 66, 14-23.
- Davis, J. A. & Gould, T. J. (2009). Hippocampal nAChRs mediate nicotine withdrawal-related learning deficits. *Eur.Neuropsychopharmacol.*, 19, 551-561.
- Day, J., Damsma, G., & Fibiger, H. C. (1991). Cholinergic activity in the rat hippocampus, cortex and striatum correlates with locomotor activity: an in vivo microdialysis study. *Pharmacol.Biochem.Behav.*, 38, 723-729.

- De Bono, J. P., Adlam, D., Paterson, D. J., & Channon, K. M. (2006). Novel quantitative phenotypes of exercise training in mouse models. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol*, 290, R926-R934.
- de Bruin, N. & Pouzet, B. (2006). Beneficial effects of galantamine on performance in the object recognition task in Swiss mice: deficits induced by scopolamine and by prolonging the retention interval. *Pharmacol.Biochem.Behav.*, 85, 253-260.
- Decker, M. W., Brioni, J. D., Bannon, A. W., & Arneric, S. P. (1995). Diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: lessons from behavior and implications for CNS therapeutics. *Life Sci.*, 56, 545-570.
- Dere, E., Frisch, C., De Souza Silva, M. A., Godecke, A., Schrader, J., & Huston, J. P. (2001). Unaltered radial maze performance and brain acetylcholine of the endothelial nitric oxide synthase knockout mouse. *Neuroscience*, 107, 561-570.
- Dere, E., Huston, J. P., & De Souza Silva, M. A. (2005). Episodic-like memory in mice: simultaneous assessment of object, place and temporal order memory. *Brain Res.Brain Res.Protoc.*, 16, 10-19.
- Dere, E., Huston, J. P., & De Souza Silva, M. A. (2007). The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neurosci.Biobehav.Rev.*, 31, 673-704.
- Dodart, J. C., Mathis, C., & Ungerer, A. (1997). Scopolamine-induced deficits in a two-trial object recognition task in mice. *Neuroreport*, 8, 1173-1178.
- Drachman, D. A. (1977). Memory and cognitive function in man: does the cholinergic system have a specific role? *Neurology*, 27, 783-790.
- Drachman, D. A. & Leavitt, J. (1974). Human memory and the cholinergic system. A relationship to aging? *Arch.Neurol.*, 30, 113-121.
- Dunbar, G. C., Inglis, F., Kuchibhatla, R., Sharma, T., Tomlinson, M., & Wamsley, J. (2007). Effect of ispronicline, a neuronal nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, in subjects with age associated memory impairment (AAMI). *J.Psychopharmacol.*, 21, 171-178.
- Ehlert, F. J., Kokka, N., & Fairhurst, A. S. (1980). Altered [3H]quinuclidinyl benzilate binding in the striatum of rats following chronic cholinesterase inhibition with diisopropylfluorophosphate. *Mol.Pharmacol.*, 17, 24-30.
- Eilers, H., Schaeffer, E., Bickler, P. E., & Forsayeth, J. R. (1997). Functional deactivation of the major neuronal nicotinic receptor caused by nicotine and a protein kinase C-dependent mechanism. *Mol.Pharmacol.*, 52, 1105-1112.
- Endres, M., Gertz, K., Lindauer, U., Katchanov, J., Schultze, J., Schrock, H., Nickenig, G., Kuschinsky, W., Dirnagl, U., & Laufs, U. (2003). Mechanisms of stroke protection by physical activity. *Ann.Neurol.*, 54, 582-590.

- Engidawork, E., Gulesserian, T., Balic, N., Cairns, N., & Lubec, G. (2001). Changes in nicotinic acetylcholine receptor subunits expression in brain of patients with Down syndrome and Alzheimer's disease. *J.Neural Transm.Suppl*, 211-222.
- Ennaceur, A. & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav.Brain Res.*, 31, 47-59.
- Ennaceur, A. & Meliani, K. (1992). Effects of physostigmine and scopolamine on rats' performances in object-recognition and radial-maze tests. *Psychopharmacology (Berl)*, 109, 321-330.
- Erickson, K. I., Voss, M. W., Prakash, R. S., Basak, C., Szabo, A., Chaddock, L., Kim, J. S., Heo, S., Alves, H., White, S. M., Wojcicki, T. R., Mailey, E., Vieira, V. J., Martin, S. A., Pence, B. D., Woods, J. A., McAuley, E., & Kramer, A. F. (2011). Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 108, 3017-3022.
- Erickson, K. I., Weinstein, A. M., & Lopez, O. L. (2012). Physical activity, brain plasticity, and Alzheimer's disease. *Arch.Med.Res.*, 43, 615-621.
- Everitt, B. J. & Robbins, T. W. (1997). Central cholinergic systems and cognition. *Annu.Rev.Psychol.*, 48, 649-684.
- Fabel, K., Fabel, K., Tam, B., Kaufer, D., Baiker, A., Simmons, N., Kuo, C. J., & Palmer, T. D. (2003). VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *Eur.J.Neurosci.*, 18, 2803-2812.
- Farmer, J., Zhao, X., van Praag, H., Wodtke, K., Gage, F. H., & Christie, B. R. (2004). Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male Sprague-Dawley rats in vivo. *Neuroscience*, 124, 71-79.
- Fenster, C. P., Rains, M. F., Noerager, B., Quick, M. W., & Lester, R. A. (1997). Influence of subunit composition on desensitization of neuronal acetylcholine receptors at low concentrations of nicotine. *J.Neurosci.*, 17, 5747-5759.
- Fenster, C. P., Whitworth, T. L., Sheffield, E. B., Quick, M. W., & Lester, R. A. (1999). Upregulation of surface alpha4beta2 nicotinic receptors is initiated by receptor desensitization after chronic exposure to nicotine. *J.Neurosci.*, 19, 4804-4814.
- Fibiger, H. C. (1991). Cholinergic mechanisms in learning, memory and dementia: a review of recent evidence. *Trends Neurosci.*, 14, 220-223.
- Ficklin, M. B., Zhao, S., & Feng, G. (2005). Ubiquilin-1 regulates nicotine-induced up-regulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J.Biol.Chem.*, 280, 34088-34095.
- Flood, J. F. & Cherkin, A. (1986). Scopolamine effects on memory retention in mice: a model of dementia? *Behav.Neural Biol.*, 45, 169-184.
- Flores, C. M., Davila-Garcia, M. I., Ulrich, Y. M., & Kellar, K. J. (1997). Differential regulation of neuronal nicotinic receptor binding sites following chronic nicotine administration. *J.Neurochem.*, 69, 2216-2219.

- Fordyce, D. E. & Wehner, J. M. (1993). Physical activity enhances spatial learning performance with an associated alteration in hippocampal protein kinase C activity in C57BL/6 and DBA/2 mice. *Brain Res.*, 619, 111-119.
- Francis, P. T., Palmer, A. M., Snape, M., & Wilcock, G. K. (1999). The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry*, 66, 137-147.
- Francois, M. & Kojda, G. (2004). Effect of hypercholesterolemia and of oxidative stress on the nitric oxide-cGMP pathway. *Neurochem.Int.*, 45, 955-961.
- Fukai, T., Siegfried, M. R., Ushio-Fukai, M., Cheng, Y., Kojda, G., & Harrison, D. G. (2000). Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J.Clin.Invest*, 105, 1631-1639.
- Gahring, L. C., Vasquez-Opazo, G. A., & Rogers, S. W. (2010). Choline promotes nicotinic receptor alpha4 + beta2 up-regulation. *J.Biol.Chem.*, 285, 19793-19801.
- Gatto, G. J., Bohme, G. A., Caldwell, W. S., Letchworth, S. R., Traina, V. M., Obinu, M. C., Laville, M., Reibaud, M., Pradier, L., Dunbar, G., & Bencherif, M. (2004). TC-1734: an orally active neuronal nicotinic acetylcholine receptor modulator with antidepressant, neuroprotective and long-lasting cognitive effects. *CNS.Drug Rev.*, 10, 147-166.
- Gewaltig, M. T. & Kojda, G. (2002). Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc.Res.*, 55, 250-260.
- Giniatullin, R., Nistri, A., & Yakel, J. L. (2005). Desensitization of nicotinic ACh receptors: shaping cholinergic signaling. *Trends Neurosci.*, 28, 371-378.
- Giorguieff-Chesselet, M. F., Kemel, M. L., Wandscheer, D., & Glowinski, J. (1979). Regulation of dopamine release by presynaptic nicotinic receptors in rat striatal slices: effect of nicotine in a low concentration. *Life Sci.*, 25, 1257-1262.
- Gold, P. E. (2003a). Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. *Neurobiol.Learn.Mem.*, 80, 194-210.
- Gold, P. E. (2003b). Acetylcholine: cognitive and brain functions. *Neurobiol.Learn.Mem.*, 80, 177.
- Gomez-Pinilla, F., Vaynman, S., & Ying, Z. (2008). Brain-derived neurotrophic factor functions as a metabotrophin to mediate the effects of exercise on cognition. *Eur.J.Neurosci.*, 28, 2278-2287.
- Gomez-Pinilla, F., Ying, Z., Roy, R. R., Molteni, R., & Edgerton, V. R. (2002). Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. *J.Neurophysiol.*, 88, 2187-2195.
- Gonzales, D., Rennard, S. I., Nides, M., Oncken, C., Azoulay, S., Billing, C. B., Watsky, E. J., Gong, J., Williams, K. E., & Reeves, K. R. (2006). Varenicline, an alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, vs sustained-release bupropion and placebo for smoking cessation: a randomized controlled trial. *JAMA*, 296, 47-55.

- Gopalakrishnan, M., Molinari, E. J., & Sullivan, J. P. (1997). Regulation of human alpha4beta2 neuronal nicotinic acetylcholine receptors by cholinergic channel ligands and second messenger pathways. *Mol.Pharmacol.*, 52, 524-534.
- Gopalakrishnan, M., Monteggia, L. M., Anderson, D. J., Molinari, E. J., Piattoni-Kaplan, M., Donnelly-Roberts, D., Arneric, S. P., & Sullivan, J. P. (1996). Stable expression, pharmacologic properties and regulation of the human neuronal nicotinic acetylcholine alpha 4 beta 2 receptor. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 276, 289-297.
- Gotti, C. & Clementi, F. (2004). Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog.Neurobiol.*, 74, 363-396.
- Gotti, C., Clementi, F., Fornari, A., Gaimarri, A., Guiducci, S., Manfredi, I., Moretti, M., Pedrazzi, P., Pucci, L., & Zoli, M. (2009). Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors. *Biochem.Pharmacol.*, 78, 703-711.
- Gotti, C., Moretti, M., Bohr, I., Ziabreva, I., Vailati, S., Longhi, R., Riganti, L., Gaimarri, A., McKeith, I. G., Perry, R. H., Aarsland, D., Larsen, J. P., Sher, E., Beattie, R., Clementi, F., & Court JA (2006). Selective nicotinic acetylcholine receptor subunit deficits identified in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies by immunoprecipitation. *Neurobiol.Dis.*, 23, 481-489.
- Gotti, C., Moretti, M., Gaimarri, A., Zanardi, A., Clementi, F., & Zoli, M. (2007). Heterogeneity and complexity of native brain nicotinic receptors. *Biochem.Pharmacol.*, 74, 1102-1111.
- Gotz, R., Raulf, F., & Scharl, M. (1992). Brain-derived neurotrophic factor is more highly conserved in structure and function than nerve growth factor during vertebrate evolution. *J.Neurochem.*, 59, 432-442.
- Gotz, R. & Scharl, M. (1994). The conservation of neurotrophic factors during vertebrate evolution. *Comp Biochem.Physiol Pharmacol.Toxicol.Endocrinol.*, 108, 1-10.
- Gould, T. J. & Higgins, J. S. (2003). Nicotine enhances contextual fear conditioning in C57BL/6J mice at 1 and 7 days post-training. *Neurobiol.Learn.Mem.*, 80, 147-157.
- Govind, A. P., Vezina, P., & Green, W. N. (2009). Nicotine-induced upregulation of nicotinic receptors: underlying mechanisms and relevance to nicotine addiction. *Biochem.Pharmacol.*, 78, 756-765.
- Grando, S. A., Horton, R. M., Pereira, E. F., Diethelm-Okita, B. M., George, P. M., Albuquerque, E. X., & Conti-Fine, B. M. (1995). A nicotinic acetylcholine receptor regulating cell adhesion and motility is expressed in human keratinocytes. *J.Invest Dermatol.*, 105, 774-781.
- Guan, Z. Z., Miao, H., Tian, J. Y., Unger, C., Nordberg, A., & Zhang, X. (2001). Suppressed expression of nicotinic acetylcholine receptors by nanomolar beta-amyloid peptides in PC12 cells. *J.Neural Transm.*, 108, 1417-1433.

- Guan, Z. Z., Zhang, X., Ravid, R., & Nordberg, A. (2000). Decreased protein levels of nicotinic receptor subunits in the hippocampus and temporal cortex of patients with Alzheimer's disease. *J.Neurochem.*, 74, 237-243.
- Hajilou, B. B. & Done, D. J. (2007). Evidence for a dissociation of structural and semantic knowledge in dementia of the Alzheimer type (DAT). *Neuropsychologia*, 45, 810-816.
- Hamid, S., Dawe, G. S., Gray, J. A., & Stephenson, J. D. (1997). Nicotine induces long-lasting potentiation in the dentate gyrus of nicotine-primed rats. *Neurosci.Res.*, 29, 81-85.
- Han, R. W., Zhang, R. S., Chang, M., Peng, Y. L., Wang, P., Hu, S. Q., Choi, C. L., Yin, M., Wang, R., & Han, Y. F. (2012). Reversal of scopolamine-induced spatial and recognition memory deficits in mice by novel multifunctional dimers bis-cognitins. *Brain Res.*, 1470, 59-68.
- Hardy, J. & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297, 353-356.
- Hasselmo, M. E. (2006). The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr.Opin.Neurobiol.*, 16, 710-715.
- Hebert, L. E., Scherr, P. A., Beckett, L. A., Albert, M. S., Pilgrim, D. M., Chown, M. J., Funkenstein, H. H., & Evans, D. A. (1995). Age-specific incidence of Alzheimer's disease in a community population. *JAMA*, 273, 1354-1359.
- Hedden, T. & Gabrieli, J. D. (2004). Insights into the ageing mind: a view from cognitive neuroscience. *Nat.Rev.Neurosci.*, 5, 87-96.
- Heeschen, C., Jang, J. J., Weis, M., Pathak, A., Kaji, S., Hu, R. S., Tsao, P. S., Johnson, F. L., & Cooke, J. P. (2001). Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis. *Nat.Med.*, 7, 833-839.
- Heeschen, C., Weis, M., Aicher, A., Dimmeler, S., & Cooke, J. P. (2002). A novel angiogenic pathway mediated by non-neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J.Clin.Invest*, 110, 527-536.
- Heyn, P., Abreu, B. C., & Ottenbacher, K. J. (2004). The effects of exercise training on elderly persons with cognitive impairment and dementia: a meta-analysis. *Arch.Phys.Med.Rehabil.*, 85, 1694-1704.
- Hill, R. D., Storandt, M., & Malley, M. (1993). The impact of long-term exercise training on psychological function in older adults. *J.Gerontol.*, 48, 12-17.
- Hock, C., Konietzko, U., Streffer, J. R., Tracy, J., Signorell, A., Muller-Tillmanns, B., Lemke, U., Henke, K., Moritz, E., Garcia, E., Wollmer, M. A., Umbricht, D., de Quervain, D. J., Hofmann, M., Maddalena, A., Papassotiropoulos, A., & Nitsch, R. M. (2003). Antibodies against beta-amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neuron*, 38, 547-554.

- Hofer, M., Pagliusi, S. R., Hohn, A., Leibrock, J., & Barde, Y. A. (1990). Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J.*, 9, 2459-2464.
- Hofman, A., Ott, A., Breteler, M. M., Bots, M. L., Slooter, A. J., van Harskamp, F., van Duijn, C. N., van Broeckhoven, C., & Grobbee, D. E. (1997). Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the Rotterdam Study. *Lancet*, 349, 151-154.
- Hong, C. J., Liou, Y. J., & Tsai, S. J. (2011). Effects of BDNF polymorphisms on brain function and behavior in health and disease. *Brain Res.Bull.*, 86, 287-297.
- Huganir, R. L. & Greengard, P. (1990). Regulation of neurotransmitter receptor desensitization by protein phosphorylation. *Neuron*, 5, 555-567.
- Hussmann, G. P., Turner, J. R., Lomazzo, E., Venkatesh, R., Cousins, V., Xiao, Y., Yasuda, R. P., Wolfe, B. B., Perry, D. C., Rezvani, A. H., Levin, E. D., Blendy, J. A., & Kellar, K. J. (2012). Chronic sazetidine-A at behaviorally active doses does not increase nicotinic cholinergic receptors in rodent brain. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 343, 441-450.
- Hussmann, G. P., Yasuda, R. P., Xiao, Y., Wolfe, B. B., & Kellar, K. J. (2011). Endogenously expressed muscarinic receptors in HEK293 cells augment up-regulation of stably expressed alpha4beta2 nicotinic receptors. *J.Biol.Chem.*, 286, 39726-39737.
- Imperato, A., Mulas, A., & Di Chiara, G. (1986). Nicotine preferentially stimulates dopamine release in the limbic system of freely moving rats. *Eur.J.Pharmacol.*, 132, 337-338.
- Ji, L. L. (1999). Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, 222, 283-292.
- Jorenby, D. E., Hays, J. T., Rigotti, N. A., Azoulay, S., Watsky, E. J., Williams, K. E., Billing, C. B., Gong, J., & Reeves, K. R. (2006). Efficacy of varenicline, an alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, vs placebo or sustained-release bupropion for smoking cessation: a randomized controlled trial. *JAMA*, 296, 56-63.
- Jorgensen, L. G., Perko, G., & Secher, N. H. (1992). Regional cerebral artery mean flow velocity and blood flow during dynamic exercise in humans. *J.Appl.Physiol*, 73, 1825-1830.
- Jungbluth, S., Bailey, K., & Barde, Y. A. (1994). Purification and characterisation of a brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin-3 (BDNF/NT-3) heterodimer. *Eur.J.Biochem.*, 221, 677-685.
- Kalmijn, S., Launer, L. J., Ott, A., Witteman, J. C., Hofman, A., & Breteler, M. M. (1997). Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study. *Ann.Neurol.*, 42, 776-782.
- Kenney, J. W. & Gould, T. J. (2008). Modulation of hippocampus-dependent learning and synaptic plasticity by nicotine. *Mol.Neurobiol.*, 38, 101-121.

- Kerr, A. L., Steuer, E. L., Pochtarev, V., & Swain, R. A. (2010). Angiogenesis but not neurogenesis is critical for normal learning and memory acquisition. *Neuroscience*, 171, 214-226.
- Kesner, R. P., Hunt, M. E., Williams, J. M., & Long, J. M. (1996). Prefrontal cortex and working memory for spatial response, spatial location, and visual object information in the rat. *Cereb.Cortex*, 6, 311-318.
- Kihara, T. & Shimohama, S. (2004). Alzheimer's disease and acetylcholine receptors. *Acta Neurobiol.Exp.(Wars.)*, 64, 99-105.
- Kihara, T., Shimohama, S., Sawada, H., Kimura, J., Kume, T., Kochiyama, H., Maeda, T., & Akaike, A. (1997). Nicotinic receptor stimulation protects neurons against beta-amyloid toxicity. *Ann.Neurol.*, 42, 159-163.
- Kim, M. N., Jutkiewicz, E. M., Zhang, M., & Gnegy, M. E. (2011). The sensitizing effect of acute nicotine on amphetamine-stimulated behavior and dopamine efflux requires activation of beta2 subunit-containing nicotinic acetylcholine receptors and glutamate N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuropharmacology*, 60, 1126-1134.
- Kim, Y. P., Kim, H. B., Jang, M. H., Lim, B. V., Kim, Y. J., Kim, H., Kim, S. S., Kim, E. H., & Kim, C. J. (2003). Magnitude- and time-dependence of the effect of treadmill exercise on cell proliferation in the dentate gyrus of rats. *Int.J.Sports Med.*, 24, 114-117.
- King, J., Huang, W., Chen, W., Heffernan, M., Shields, J., Rane, P., Bircher, R., & DiFranza, J. R. (2011). A comparison of brain and behavioral effects of varenicline and nicotine in rats. *Behav.Brain Res.*, 223, 42-47.
- Kleim, J. A., Cooper, N. R., & VandenBerg, P. M. (2002). Exercise induces angiogenesis but does not alter movement representations within rat motor cortex. *Brain Res.*, 934, 1-6.
- Klinkenberg, I. & Blokland, A. (2010). The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: a review of animal behavioral studies. *Neurosci.Biobehav.Rev.*, 34, 1307-1350.
- Kögel, D., Deller, T., & Behl, C. (2012). Roles of amyloid precursor protein family members in neuroprotection, stress signaling and aging. *Exp.Brain Res.*, 217, 471-479.
- Kojda, G., Cheng, Y. C., Burchfield, J., & Harrison, D. G. (2001). Dysfunctional regulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in response to exercise in mice lacking one eNOS gene. *Circulation*, 103, 2839-2844.
- Kojda, G. & Hambrecht, R. (2005). Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? *Cardiovasc.Res.*, 67, 187-197.
- Koval, L. M., Zverkova, A. S., Grailhe, R., Utkin, Y. N., Tsetlin, V. I., Komisarenko, S. V., & Skok, M. V. (2008). Nicotinic acetylcholine receptors alpha4beta2 and alpha7 regulate myelo- and erythropoiesis within the bone marrow. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, 40, 980-990.

- Kramer, A. F., Erickson, K. I., & Colcombe, S. J. (2006). Exercise, cognition, and the aging brain. *J.Appl.Physiol*, 101, 1237-1242.
- Kramer, A. F., Hahn, S., Cohen, N. J., Banich, M. T., McAuley, E., Harrison, C. R., Chason, J., Vakil, E., Bardell, L., Boileau, R. A., & Colcombe, A. (1999). Ageing, fitness and neurocognitive function. *Nature*, 400, 418-419.
- Kuhn, H. G., Dickinson-Anson, H., & Gage, F. H. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J.Neurosci.*, 16, 2027-2033.
- Kumar, P. & Meizel, S. (2005). Nicotinic acetylcholine receptor subunits and associated proteins in human sperm. *J.Biol.Chem.*, 280, 25928-25935.
- Kume, T., Sugimoto, M., Takada, Y., Yamaguchi, T., Yonezawa, A., Katsuki, H., Sugimoto, H., & Akaike, A. (2005). Up-regulation of nicotinic acetylcholine receptors by central-type acetylcholinesterase inhibitors in rat cortical neurons. *Eur.J.Pharmacol.*, 527, 77-85.
- Laaksonen, D. E., Lindstrom, J., Lakka, T. A., Eriksson, J. G., Niskanen, L., Wikstrom, K., Aunola, S., Keinanen-Kiukaanniemi, S., Laakso, M., Valle, T. T., Ilanne-Parikka, P., Louheranta, A., Hamalainen, H., Rastas, M., Salminen, V., Cepaitis, Z., Hakumaki, M., Kaikkonen, H., Harkonen, P., Sundvall, J., Tuomilehto, J., & Uusitupa, M. (2005). Physical activity in the prevention of type 2 diabetes: the Finnish diabetes prevention study. *Diabetes*, 54, 158-165.
- Laatu, S., Revonsuo, A., Jaykka, H., Portin, R., & Rinne, J. O. (2003). Visual object recognition in early Alzheimer's disease: deficits in semantic processing. *Acta Neurol.Scand.*, 108, 82-89.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lancaster, T. & Stead, L. F. (2000). Mecamylamine (a nicotine antagonist) for smoking cessation. *Cochrane.Database.Syst.Rev.*, CD001009.
- Lange-Asschenfeldt, C. & Kojda, G. (2008). Alzheimer's disease, cerebrovascular dysfunction and the benefits of exercise: from vessels to neurons. *Exp.Gerontol.*, 43, 499-504.
- Larson, E. B., Wang, L., Bowen, J. D., McCormick, W. C., Teri, L., Crane, P., & Kukull, W. (2006). Exercise is associated with reduced risk for incident dementia among persons 65 years of age and older. *Ann.Intern.Med.*, 144, 73-81.
- Lauer, N., Suvorava, T., Ruther, U., Jacob, R., Meyer, W., Harrison, D. G., & Kojda, G. (2005). Critical involvement of hydrogen peroxide in exercise-induced up-regulation of endothelial NO synthase. *Cardiovasc.Res.*, 65, 254-262.
- Laurin, D., Verreault, R., Lindsay, J., MacPherson, K., & Rockwood, K. (2001). Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons. *Arch.Neurol.*, 58, 498-504.

- Laurindo, F. R., Pedro, M. A., Barbeiro, H. V., Pileggi, F., Carvalho, M. H., Augusto, O., & da Luz, P. L. (1994). Vascular free radical release. Ex vivo and in vivo evidence for a flow-dependent endothelial mechanism. *Circ.Res.*, 74, 700-709.
- Lena, C. & Changeux, J. P. (1998). Allosteric nicotinic receptors, human pathologies. *J.Physiol Paris*, 92, 63-74.
- Lenzken, S. C., Lanni, C., Govoni, S., Lucchelli, A., Schettini, G., & Racchi, M. (2007). Nicotinic component of galantamine in the regulation of amyloid precursor protein processing. *Chem.Biol.Interact.*, 165, 138-145.
- Leonard, S., Adler, L. E., Benhammou, K., Berger, R., Breese, C. R., Drebing, C., Gault, J., Lee, M. J., Logel, J., Olincy, A., Ross, R. G., Stevens, K., Sullivan, B., Vianzon, R., Virnich, D. E., Waldo, M., Walton, K., & Freedman, R. (2001). Smoking and mental illness. *Pharmacol.Biochem.Behav.*, 70, 561-570.
- Lessmann, V., Gottmann, K., & Malcangio, M. (2003). Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog.Neurobiol.*, 69, 341-374.
- Levin, E. D., Bettgowda, C., Blosser, J., & Gordon, J. (1999). AR-R17779, and alpha7 nicotinic agonist, improves learning and memory in rats. *Behav.Pharmacol.*, 10, 675-680.
- Levin, E. D., McClernon, F. J., & Rezvani, A. H. (2006). Nicotinic effects on cognitive function: behavioral characterization, pharmacological specification, and anatomic localization. *Psychopharmacology (Berl)*, 184, 523-539.
- Levin, E. D. & Simon, B. B. (1998). Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. *Psychopharmacology (Berl)*, 138, 217-230.
- Liu, J., Li, L., & Suo, W. Z. (2009). HT22 hippocampal neuronal cell line possesses functional cholinergic properties. *Life Sci.*, 84, 267-271.
- Liu, Q. R., Walther, D., Drgon, T., Polesskaya, O., Lesnick, T. G., Strain, K. J., de Andrade M., Bower, J. H., Maraganore, D. M., & Uhl, G. R. (2005). Human brain derived neurotrophic factor (BDNF) genes, splicing patterns, and assessments of associations with substance abuse and Parkinson's Disease. *Am.J.Med.Genet.B Neuropsychiatr.Genet.*, 134B, 93-103.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-408.
- Macklin, K. D., Maus, A. D., Pereira, E. F., Albuquerque, E. X., & Conti-Fine, B. M. (1998). Human vascular endothelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 287, 435-439.
- Maizel, J. V., Summers, D. F., & Scharff, M. D. (1970). SDS-acrylamide gel electrophoresis and its application to the proteins of poliovirus- and adenovirus-infected human cells. *J.Cell Physiol*, 76, 273-287.
- Malenka, R. C. & Bear, M. F. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron*, 44, 5-21.

- Mansvelder, H. D. & McGehee, D. S. (2000). Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine. *Neuron*, 27, 349-357.
- Mansvelder, H. D. & McGehee, D. S. (2002). Cellular and synaptic mechanisms of nicotine addiction. *J.Neurobiol.*, 53, 606-617.
- Marks, M. J., Burch, J. B., & Collins, A. C. (1983). Effects of chronic nicotine infusion on tolerance development and nicotinic receptors. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 226, 817-825.
- Marks, M. J., Pauly, J. R., Gross, S. D., Deneris, E. S., Hermans-Borgmeyer, I., Heinemann, S. F., & Collins, A. C. (1992). Nicotine binding and nicotinic receptor subunit RNA after chronic nicotine treatment. *J.Neurosci.*, 12, 2765-2784.
- Marks, M. J., Stitzel, J. A., & Collins, A. C. (1986). Dose-response analysis of nicotine tolerance and receptor changes in two inbred mouse strains. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 239, 358-364.
- Marlatt, M. W., Potter, M. C., Lucassen, P. J., & van Praag, H. (2012). Running throughout middle-age improves memory function, hippocampal neurogenesis, and BDNF levels in female C57BL/6J mice. *Dev.Neurobiol.*, 72, 943-952.
- Martin-Ruiz, C. M., Court JA, Molnar, E., Lee, M., Gotti, C., Mamalaki, A., Tsouloufis, T., Tzartos, S., Ballard, C., Perry, R. H., & Perry, E. K. (1999). Alpha4 but not alpha3 and alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subunits are lost from the temporal cortex in Alzheimer's disease. *J.Neurochem.*, 73, 1635-1640.
- Marubio, L. M., Gardier, A. M., Durier, S., David, D., Klink, R., Arroyo-Jimenez, M. M., McIntosh, J. M., Rossi, F., Champtiaux, N., Zoli, M., & Changeux, J. P. (2003). Effects of nicotine in the dopaminergic system of mice lacking the alpha4 subunit of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Eur.J.Neurosci.*, 17, 1329-1337.
- Maskos, U., Molles, B. E., Pons, S., Besson, M., Guiard, B. P., Guilloux, J. P., Evrard, A., Cazala, P., Cormier, A., Mameli-Engvall, M., Dufour, N., Cloez-Tayarani, I., Bemelmans, A. P., Mallet, J., Gardier, A. M., David, V., Faure, P., Granon, S., & Changeux, J. P. (2005). Nicotine reinforcement and cognition restored by targeted expression of nicotinic receptors. *Nature*, 436, 103-107.
- Masuoka, T. & Kamei, C. (2009). The role of nicotinic receptors in the amelioration of cholinesterase inhibitors in scopolamine-induced memory deficits. *Psychopharmacology (Berl)*, 206, 259-265.
- Mathers, C. D. & Loncar, D. (2006). Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS.Med.*, 3, e442.
- Matsuyama, S. & Matsumoto, A. (2003). Epibatidine induces long-term potentiation (LTP) via activation of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) in vivo in the intact mouse dentate gyrus: both alpha7 and alpha4beta2 nAChRs essential to nicotinic LTP. *J.Pharmacol.Sci.*, 93, 180-187.

- Matsuyama, S., Matsumoto, A., Enomoto, T., & Nishizaki, T. (2000). Activation of nicotinic acetylcholine receptors induces long-term potentiation in vivo in the intact mouse dentate gyrus. *Eur.J.Neurosci.*, 12, 3741-3747.
- Mattson, M. P., Cheng, B., Culwell, A. R., Esch, F. S., Lieberburg, I., & Rydel, R. E. (1993). Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron*, 10, 243-254.
- Mattson, M. P. & Furukawa, K. (1998). Signaling events regulating the neurodevelopmental triad. Glutamate and secreted forms of beta-amyloid precursor protein as examples. *Perspect.Dev.Neurobiol.*, 5, 337-352.
- McCallum, S. E., Parameswaran, N., Bordia, T., Fan, H., McIntosh, J. M., & Quik, M. (2006). Differential regulation of mesolimbic alpha 3/alpha 6 beta 2 and alpha 4 beta 2 nicotinic acetylcholine receptor sites and function after long-term oral nicotine to monkeys. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 318, 381-388.
- McColl, S. L., Burstein, A. H., Reeves, K. R., Billing, C. B., Jr., Stolar, M., & Sellers, E. M. (2008). Human abuse liability of the smoking cessation drug varenicline in smokers and nonsmokers. *Clin.Pharmacol.Ther.*, 83, 607-614.
- McKee, S. A., Harrison, E. L., O'Malley, S. S., Krishnan-Sarin, S., Shi, J., Tetrault, J. M., Picciotto, M. R., Petrakis, I. L., Estevez, N., & Balchunas, E. (2009). Varenicline reduces alcohol self-administration in heavy-drinking smokers. *Biol.Psychiatry*, 66, 185-190.
- Messier, C. (1997). Object recognition in mice: improvement of memory by glucose. *Neurobiol.Learn.Mem.*, 67, 172-175.
- Mihalak, K. B., Carroll, F. I., & Luetje, C. W. (2006). Varenicline is a partial agonist at alpha4beta2 and a full agonist at alpha7 neuronal nicotinic receptors. *Mol.Pharmacol.*, 70, 801-805.
- Mohammed, A. H. (1993). Effects of cholinesterase inhibitors on learning and memory in rats: a brief review with special reference to THA. *Acta Neurol.Scand.Suppl*, 149, 13-15.
- Moraine, J. J., Lamotte, M., Berre, J., Niset, G., Leduc, A., & Naeije, R. (1993). Relationship of middle cerebral artery blood flow velocity to intensity during dynamic exercise in normal subjects. *Eur.J.Appl.Physiol Occup.Physiol*, 67, 35-38.
- Morimoto, B. H. & Koshland, D. E., Jr. (1990). Induction and expression of long- and short-term neurosecretory potentiation in a neural cell line. *Neuron*, 5, 875-880.
- Mount, P. F., Kemp, B. E., & Power, D. A. (2007). Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J.Mol.Cell Cardiol.*, 42, 271-279.
- Mueller, K. & Peel, J. L. (1990). Scopolamine produces locomotor stereotypy in an open field but apomorphine does not. *Pharmacol.Biochem.Behav.*, 36, 613-617.

- Mulle, C., Choquet, D., Korn, H., & Changeux, J. P. (1992). Calcium influx through nicotinic receptor in rat central neurons: its relevance to cellular regulation. *Neuron*, 8, 135-143.
- Mumby, D. G., Gaskin, S., Glenn, M. J., Schramek, T. E., & Lehmann, H. (2002). Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: memory for objects, places, and contexts. *Learn.Mem.*, 9, 49-57.
- Murer, M. G., Yan, Q., & Raisman-Vozari, R. (2001). Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog.Neurobiol.*, 63, 71-124.
- Murray, E. A. & Richmond, B. J. (2001). Role of perirhinal cortex in object perception, memory, and associations. *Curr.Opin.Neurobiol.*, 11, 188-193.
- Murray, T. K., Cross, A. J., & Green, A. R. (1991). Reversal by tetrahydroaminoacridine of scopolamine-induced memory and performance deficits in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 105, 134-136.
- Nashmi, R., Dickinson, M. E., McKinney, S., Jareb, M., Labarca, C., Fraser, S. E., & Lester, H. A. (2003). Assembly of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors assessed with functional fluorescently labeled subunits: effects of localization, trafficking, and nicotine-induced upregulation in clonal mammalian cells and in cultured midbrain neurons. *J.Neurosci.*, 23, 11554-11567.
- Neeper, S. A., Gomez-Pinilla, F., Choi, J., & Cotman, C. (1995). Exercise and brain neurotrophins. *Nature*, 373, 109.
- Neeper, S. A., Gomez-Pinilla, F., Choi, J., & Cotman, C. W. (1996). Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. *Brain Res.*, 726, 49-56.
- Newhouse, P. A., Potter, A., Kelton, M., & Corwin, J. (2001). Nicotinic treatment of Alzheimer's disease. *Biol.Psychiatry*, 49, 268-278.
- Nguyen, H. N., Rasmussen, B. A., & Perry, D. C. (2003). Subtype-selective up-regulation by chronic nicotine of high-affinity nicotinic receptors in rat brain demonstrated by receptor autoradiography. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 307, 1090-1097.
- Nguyen, H. N., Rasmussen, B. A., & Perry, D. C. (2004). Binding and functional activity of nicotinic cholinergic receptors in selected rat brain regions are increased following long-term but not short-term nicotine treatment. *J.Neurochem.*, 90, 40-49.
- Nides, M., Oncken, C., Gonzales, D., Rennard, S., Watsky, E. J., Anziano, R., & Reeves, K. R. (2006). Smoking cessation with varenicline, a selective alpha4beta2 nicotinic receptor partial agonist: results from a 7-week, randomized, placebo- and bupropion-controlled trial with 1-year follow-up. *Arch.Intern.Med.*, 166, 1561-1568.
- Nie, H., Li, Z., Lukas, R. J., Shen, Y., Song, L., Wang, X., & Yin, M. (2008). Construction of SH-EP1-alpha4beta2-hAPP695 cell line and effects of nicotinic agonists on beta-amyloid in the cells. *Cell Mol.Neurobiol.*, 28, 103-112.

- Nishida, K., Harrison, D. G., Navas, J. P., Fisher, A. A., Dockery, S. P., Uematsu, M., Nerem, R. M., Alexander, R. W., & Murphy, T. J. (1992). Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J.Clin.Invest*, 90, 2092-2096.
- Nott, A. & Levin, E. D. (2006). Dorsal hippocampal alpha7 and alpha4beta2 nicotinic receptors and memory. *Brain Res.*, 1081, 72-78.
- O'Callaghan, R. M., Ohle, R., & Kelly, A. M. (2007). The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: A comparison of LTP, spatial- and non-spatial learning. *Behav.Brain Res.*, 176, 362-366.
- Obach, R. S., Reed-Hagen, A. E., Krueger, S. S., Obach, B. J., O'Connell, T. N., Zandi, K. S., Miller, S., & Coe, J. W. (2006). Metabolism and disposition of varenicline, a selective alpha4beta2 acetylcholine receptor partial agonist, in vivo and in vitro. *Drug Metab Dispos.*, 34, 121-130.
- Obinu, M. C., Reibaud, M., Miquet, J. M., Pasquet, M., & Rooney, T. (2002). Brain-selective stimulation of nicotinic receptors by TC-1734 enhances ACh transmission from frontoparietal cortex and memory in rodents. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry*, 26, 913-918.
- Ochoa, E. L., Chattopadhyay, A., & McNamee, M. G. (1989). Desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor: molecular mechanisms and effect of modulators. *Cell Mol.Neurobiol.*, 9, 141-178.
- Ochoa, E. L. & Lasalde-Dominicci, J. (2007). Cognitive deficits in schizophrenia: focus on neuronal nicotinic acetylcholine receptors and smoking. *Cell Mol.Neurobiol.*, 27, 609-639.
- Ogoh, S. & Ainslie, P. N. (2009). Cerebral blood flow during exercise: mechanisms of regulation. *J.Appl.Physiol*, 107, 1370-1380.
- Ono, K. & Yamada, M. (2011). Low-n oligomers as therapeutic targets of Alzheimer's disease. *J.Neurochem.*, 117, 19-28.
- Oppermann, M., Balz, V., Adams, V., Dao, V. T., Bas, M., Suvorava, T., & Kojda, G. (2009). Pharmacological induction of vascular extracellular superoxide dismutase expression in vivo. *J.Cell Mol.Med.*, 13, 1271-1278.
- Ott, A., Slooter, A. J., Hofman, A., van Harskamp, F., Witteman, J. C., Van Broeckhoven, C., van Duijn, C. M., & Breteler, M. M. (1998). Smoking and risk of dementia and Alzheimer's disease in a population-based cohort study: the Rotterdam Study. *Lancet*, 351, 1840-1843.
- Palmer, A. M. & Gershon, S. (1990). Is the neuronal basis of Alzheimer's disease cholinergic or glutamatergic? *FASEB J.*, 4, 2745-2752.
- Papadopoulou, S., Hartmann, P., Lips, K. S., Kummer, W., & Haberberger, R. V. (2004). Nicotinic receptor mediated stimulation of NO-generation in neurons of rat thoracic dorsal root ganglia. *Neurosci.Lett.*, 361, 32-35.

- Papke, R. L. & Heinemann, S. F. (1994). Partial agonist properties of cytisine on neuronal nicotinic receptors containing the beta 2 subunit. *Mol.Pharmacol.*, 45, 142-149.
- Papke, R. L., Sanberg, P. R., & Shytle, R. D. (2001). Analysis of mecamylamine stereoisomers on human nicotinic receptor subtypes. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 297, 646-656.
- Parent, M. B. & Baxter, M. G. (2004). Septohippocampal acetylcholine: involved in but not necessary for learning and memory? *Learn.Mem.*, 11, 9-20.
- Paterson, D. & Nordberg, A. (2000). Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Prog.Neurobiol.*, 61, 75-111.
- Patterson, F., Jepson, C., Strasser, A. A., Loughhead, J., Perkins, K. A., Gur, R. C., Frey, J. M., Siegel, S., & Lerman, C. (2009). Varenicline improves mood and cognition during smoking abstinence. *Biol.Psychiatry*, 65, 144-149.
- Patterson, S. L., Grover, L. M., Schwartzkroin, P. A., & Bothwell, M. (1992). Neurotrophin expression in rat hippocampal slices: a stimulus paradigm inducing LTP in CA1 evokes increases in BDNF and NT-3 mRNAs. *Neuron*, 9, 1081-1088.
- Pauly, J. R., Marks, M. J., Robinson, S. F., van de Kamp, J. L., & Collins, A. C. (1996). Chronic nicotine and mecamylamine treatment increase brain nicotinic receptor binding without changing alpha 4 or beta 2 mRNA levels. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 278, 361-369.
- Peng, X., Gerzanich, V., Anand, R., Whiting, P. J., & Lindstrom, J. (1994). Nicotine-induced increase in neuronal nicotinic receptors results from a decrease in the rate of receptor turnover. *Mol.Pharmacol.*, 46, 523-530.
- Penton, R. E. & Lester, R. A. (2009). Cellular events in nicotine addiction. *Semin.Cell Dev.Biol.*, 20, 418-431.
- Pereira, A. C., Huddleston, D. E., Brickman, A. M., Sosunov, A. A., Hen, R., McKhann, G. M., Sloan, R., Gage, F. H., Brown, T. R., & Small, S. A. (2007). An in vivo correlate of exercise-induced neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 104, 5638-5643.
- Perry, D. C., Davila-Garcia, M. I., Stockmeier, C. A., & Kellar, K. J. (1999). Increased nicotinic receptors in brains from smokers: membrane binding and autoradiography studies. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 289, 1545-1552.
- Picciotto, M. R. & Zoli, M. (2002). Nicotinic receptors in aging and dementia. *J.Neurobiol.*, 53, 641-655.
- Picciotto, M. R., Zoli, M., Rimondini, R., Lena, C., Marubio, L. M., Pich, E. M., Fuxe, K., & Changeux, J. P. (1998). Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. *Nature*, 391, 173-177.
- Pitsikas, N. (2007). Effects of scopolamine and L-NAME on rats' performance in the object location test. *Behav.Brain Res.*, 179, 294-298.

- Placzek, A. N., Zhang, T. A., & Dani, J. A. (2009). Nicotinic mechanisms influencing synaptic plasticity in the hippocampus. *Acta Pharmacol.Sin.*, 30, 752-760.
- Podewils, L. J., Guallar, E., Kuller, L. H., Fried, L. P., Lopez, O. L., Carlson, M., & Lyketsos, C. G. (2005). Physical activity, APOE genotype, and dementia risk: findings from the Cardiovascular Health Cognition Study. *Am.J.Epidemiol.*, 161, 639-651.
- Potter, A., Corwin, J., Lang, J., Piasecki, M., Lenox, R., & Newhouse, P. A. (1999). Acute effects of the selective cholinergic channel activator (nicotinic agonist) ABT-418 in Alzheimer's disease. *Psychopharmacology (Berl)*, 142, 334-342.
- Prickaerts, J., Sik, A., van der Staay, F. J., de Vente, J., & Blokland, A. (2005). Dissociable effects of acetylcholinesterase inhibitors and phosphodiesterase type 5 inhibitors on object recognition memory: acquisition versus consolidation. *Psychopharmacology (Berl)*, 177, 381-390.
- Puma, C., Deschaux, O., Molimard, R., & Bizot, J. C. (1999). Nicotine improves memory in an object recognition task in rats. *Eur.Neuropsychopharmacol.*, 9, 323-327.
- Purdy, K. S., McMullen, P. A., & Freedman, M. (2002). Changes to the object recognition system in patients with dementia of the Alzheimer's type. *Brain Cogn*, 49, 213-216.
- Quick, M. W. & Lester, R. A. (2002). Desensitization of neuronal nicotinic receptors. *J.Neurobiol.*, 53, 457-478.
- Racchi, M., Mazzucchelli, M., Porrello, E., Lanni, C., & Govoni, S. (2004). Acetylcholinesterase inhibitors: novel activities of old molecules. *Pharmacol.Res.*, 50, 441-451.
- Raggenbass, M. & Bertrand, D. (2002). Nicotinic receptors in circuit excitability and epilepsy. *J.Neurobiol.*, 53, 580-589.
- Raz, N., Lindenberger, U., Rodrigue, K. M., Kennedy, K. M., Head, D., Williamson, A., Dahle, C., Gerstorf, D., & Acker, J. D. (2005). Regional brain changes in aging healthy adults: general trends, individual differences and modifiers. *Cereb.Cortex*, 15, 1676-1689.
- Rezvani, K., Teng, Y., Shim, D., & De Biasi M. (2007). Nicotine regulates multiple synaptic proteins by inhibiting proteasomal activity. *J.Neurosci.*, 27, 10508-10519.
- Ritchie, C. W., Ames, D., Clayton, T., & Lai, R. (2004). Metaanalysis of randomized trials of the efficacy and safety of donepezil, galantamine, and rivastigmine for the treatment of Alzheimer disease. *Am.J.Geriatr.Psychiatry*, 12, 358-369.
- Rochford, J., Sen, A. P., & Quirion, R. (1996). Effect of nicotine and nicotinic receptor agonists on latent inhibition in the rat. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 277, 1267-1275.
- Rogers, R. L., Meyer, J. S., & Mortel, K. F. (1990). After reaching retirement age physical activity sustains cerebral perfusion and cognition. *J.Am.Geriatr.Soc.*, 38, 123-128.
- Rollema, H., Chambers, L. K., Coe, J. W., Glowa, J., Hurst, R. S., Lebel, L. A., Lu, Y., Mansbach, R. S., Mather, R. J., Rovetti, C. C., Sands, S. B., Schaeffer, E., Schulz, D. W.,

- Tingley, F. D., III, & Williams, K. E. (2007a). Pharmacological profile of the alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor partial agonist varenicline, an effective smoking cessation aid. *Neuropharmacology*, 52, 985-994.
- Rollema, H., Coe, J. W., Chambers, L. K., Hurst, R. S., Stahl, S. M., & Williams, K. E. (2007b). Rationale, pharmacology and clinical efficacy of partial agonists of alpha4beta2 nACh receptors for smoking cessation. *Trends Pharmacol.Sci.*, 28, 316-325.
- Rollema, H., Guanowsky, V., Mineur, Y. S., Shrikhande, A., Coe, J. W., Seymour, P. A., & Picciotto, M. R. (2009a). Varenicline has antidepressant-like activity in the forced swim test and augments sertraline's effect. *Eur.J.Pharmacol.*, 605, 114-116.
- Rollema, H., Hajos, M., Seymour, P. A., Kozak, R., Majchrzak, M. J., Guanowsky, V., Horner, W. E., Chapin, D. S., Hoffmann, W. E., Johnson, D. E., McLean, S., Freeman, J., & Williams, K. E. (2009b). Preclinical pharmacology of the alpha4beta2 nAChR partial agonist varenicline related to effects on reward, mood and cognition. *Biochem.Pharmacol.*, 78, 813-824.
- Rollema, H., Shrikhande, A., Ward, K. M., Tingley, F. D., III, Coe, J. W., O'Neill, B. T., Tseng, E., Wang, E. Q., Mather, R. J., Hurst, R. S., Williams, K. E., de Vries M., Cremers, T., Bertrand, S., & Bertrand, D. (2010). Pre-clinical properties of the alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor partial agonists varenicline, cytisine and dianicline translate to clinical efficacy for nicotine dependence. *Br.J.Pharmacol.*, 160, 334-345.
- Rose, J. E., Behm, F. M., Westman, E. C., & Coleman, R. E. (1999). Arterial nicotine kinetics during cigarette smoking and intravenous nicotine administration: implications for addiction. *Drug Alcohol Depend.*, 56, 99-107.
- Rose, J. E. & Levin, E. D. (1992). Concurrent agonist-antagonist administration for the analysis and treatment of drug dependence. *Pharmacol.Biochem.Behav.*, 41, 219-226.
- Rosenthal, A., Goeddel, D. V., Nguyen, T., Martin, E., Burton, L. E., Shih, A., Laramee, G. R., Wurm, F., Mason, A., & Nikolics, K. (1991). Primary structure and biological activity of human brain-derived neurotrophic factor. *Endocrinology*, 129, 1289-1294.
- Rothhut, B., Romano, S. J., Vijayaraghavan, S., & Berg, D. K. (1996). Post-translational regulation of neuronal acetylcholine receptors stably expressed in a mouse fibroblast cell line. *J.Neurobiol.*, 29, 115-125.
- Rowell, P. P. & Wonnacott, S. (1990). Evidence for functional activity of up-regulated nicotine binding sites in rat striatal synaptosomes. *J.Neurochem.*, 55, 2105-2110.
- Rusted, J. M., Newhouse, P. A., & Levin, E. D. (2000). Nicotinic treatment for degenerative neuropsychiatric disorders such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Behav.Brain Res.*, 113, 121-129.
- Sagara, Y., Dargusch, R., Chambers, D., Davis, J., Schubert, D., & Maher, P. (1998). Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. *Free Radic.Biol.Med.*, 24, 1375-1389.

- Salette, J., Pons, S., Devillers-Thiery, A., Soudant, M., Prado de Carvalho, L., Changeux, J. P., & Corringier, P. J. (2005). Nicotine upregulates its own receptors through enhanced intracellular maturation. *Neuron*, 46, 595-607.
- Sambeth, A., Riedel, W. J., Smits, L. T., & Blokland, A. (2007). Cholinergic drugs affect novel object recognition in rats: relation with hippocampal EEG? *Eur.J.Pharmacol.*, 572, 151-159.
- Samuels, H. H. & Tsai, J. S. (1973). Thyroid hormone action in cell culture: demonstration of nuclear receptors in intact cells and isolated nuclei. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 70, 3488-3492.
- Sarter, M., Bruno, J. P., & Givens, B. (2003). Attentional functions of cortical cholinergic inputs: what does it mean for learning and memory? *Neurobiol.Learn.Mem.*, 80, 245-256.
- Schäble, S., Huston, J. P., Barros, M., Tomaz, C., & De Souza Silva, M. A. (2012). The NK3 receptor agonist senktide ameliorates scopolamine-induced deficits in memory for object, place and temporal order. *Neurobiol.Learn.Mem.*, 97, 235-240.
- Schiller, G. D. (1979). Reduced binding of (3H)-quinuclidinyl benzilate associated with chronically low acetylcholinesterase activity. *Life Sci.*, 24, 1159-1163.
- Schliebs, R. & Arendt, T. (2006). The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *J.Neural Transm.*, 113, 1625-1644.
- Schliebs, R. & Arendt, T. (2011). The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav.Brain Res.*, 221, 555-563.
- Schmeller, T., Sporer, F., Sauerwein, M., & Wink, M. (1995). Binding of tropane alkaloids to nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmazie*, 50, 493-495.
- Schmidt, W., Endres, M., Dimeo, F., & Jungehulsing, G. J. (2013). Train the vessel, gain the brain: physical activity and vessel function and the impact on stroke prevention and outcome in cerebrovascular disease. *Cerebrovasc.Dis.*, 35, 303-312.
- Schwartz, R. D. & Kellar, K. J. (1983). Nicotinic cholinergic receptor binding sites in the brain: regulation in vivo. *Science*, 220, 214-216.
- Schwartz, R. D. & Kellar, K. J. (1985). In vivo regulation of [3H]acetylcholine recognition sites in brain by nicotinic cholinergic drugs. *J.Neurochem.*, 45, 427-433.
- Seidah, N. G., Benjannet, S., Pareek, S., Chretien, M., & Murphy, R. A. (1996). Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases. *FEBS Lett.*, 379, 247-250.
- Sessa, W. C., Pritchard, K., Seyedi, N., Wang, J., & Hintze, T. H. (1994). Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ.Res.*, 74, 349-353.

- Shanker, G., Kontos, J. L., Eckman, D. M., Wesley-Farrington, D., & Sane, D. C. (2006). Nicotine upregulates the expression of P2Y<sub>12</sub> on vascular cells and megakaryoblasts. *J.Thromb.Thrombolysis.*, 22, 213-220.
- Shannon, H. E., Bemis, K. G., Hendrix, J. C., & Ward, J. S. (1990). Interactions between scopolamine and muscarinic cholinergic agonists or cholinesterase inhibitors on spatial alternation performance in rats. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 255, 1071-1077.
- Shen, H., Tong, L., Balazs, R., & Cotman, C. W. (2001). Physical activity elicits sustained activation of the cyclic AMP response element-binding protein and mitogen-activated protein kinase in the rat hippocampus. *Neuroscience*, 107, 219-229.
- Shen, W., Zhang, X., Zhao, G., Wolin, M. S., Sessa, W., & Hintze, T. H. (1995). Nitric oxide production and NO synthase gene expression contribute to vascular regulation during exercise. *Med.Sci.Sports Exerc.*, 27, 1125-1134.
- Shesely, E. G., Maeda, N., Kim, H. S., Desai, K. M., Krege, J. H., Laubach, V. E., Sherman, P. A., Sessa, W. C., & Smithies, O. (1996). Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 93, 13176-13181.
- Shiroma, E. J. & Lee, I. M. (2010). Physical activity and cardiovascular health: lessons learned from epidemiological studies across age, gender, and race/ethnicity. *Circulation*, 122, 743-752.
- Sik, A., van Nieuwehuyzen, P., Prickaerts, J., & Blokland, A. (2003). Performance of different mouse strains in an object recognition task. *Behav.Brain Res.*, 147, 49-54.
- Silagy, C., Lancaster, T., Stead, L., Mant, D., & Fowler, G. (2004). Nicotine replacement therapy for smoking cessation. *Cochrane.Database.Syst.Rev.*, CD000146.
- Snyder, P. J., Bednar, M. M., Cromer, J. R., & Maruff, P. (2005). Reversal of scopolamine-induced deficits with a single dose of donepezil, an acetylcholinesterase inhibitor. *Alzheimers.Dement.*, 1, 126-135.
- Squire, L. R. & Zola, S. M. (1996). Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 93, 13515-13522.
- Steensland, P., Simms, J. A., Holgate, J., Richards, J. K., & Bartlett, S. E. (2007). Varenicline, an alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, selectively decreases ethanol consumption and seeking. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 104, 12518-12523.
- Stollberg, J. & Berg, D. K. (1987). Neuronal acetylcholine receptors: fate of surface and internal pools in cell culture. *J.Neurosci.*, 7, 1809-1815.
- Stranahan, A. M., Lee, K., Becker, K. G., Zhang, Y., Maudsley, S., Martin, B., Cutler, R. G., & Mattson, M. P. (2010). Hippocampal gene expression patterns underlying the enhancement of memory by running in aged mice. *Neurobiol.Aging*, 31, 1937-1949.
- Suhara, T., Magrane, J., Rosen, K., Christensen, R., Kim, H. S., Zheng, B., McPhie, D. L., Walsh, K., & Querfurth, H. (2003). Abeta<sub>42</sub> generation is toxic to endothelial cells and

inhibits eNOS function through an Akt/GSK-3 $\beta$  signaling-dependent mechanism. *Neurobiol.Aging*, 24, 437-451.

Suvorava, T., Kumpf, S., Rauch, B. H., Dao, V. T., Adams, V., & Kojda, G. (2010). Hydrogen peroxide inhibits exercise-induced increase of circulating stem cells with endothelial progenitor capacity. *Free Radic.Res.*, 44, 199-207.

Suvorava, T., Lauer, N., Kumpf, S., Jacob, R., Meyer, W., & Kojda, G. (2005). Endogenous vascular hydrogen peroxide regulates arteriolar tension in vivo. *Circulation*, 112, 2487-2495.

Takada, Y., Yonezawa, A., Kume, T., Katsuki, H., Kaneko, S., Sugimoto, H., & Akaike, A. (2003). Nicotinic acetylcholine receptor-mediated neuroprotection by donepezil against glutamate neurotoxicity in rat cortical neurons. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 306, 772-777.

Taly, A., Corringer, P. J., Guedin, D., Lestage, P., & Changeux, J. P. (2009). Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat.Rev.Drug Discov.*, 8, 733-750.

Tapia, L., Kuryatov, A., & Lindstrom, J. (2007). Ca<sup>2+</sup> permeability of the (alpha4)<sub>3</sub>(beta2)<sub>2</sub> stoichiometry greatly exceeds that of (alpha4)<sub>2</sub>(beta2)<sub>3</sub> human acetylcholine receptors. *Mol.Pharmacol.*, 71, 769-776.

Taylor, A. L. & Bettcher, D. W. (2000). WHO Framework Convention on Tobacco Control: a global "good" for public health. *Bull.World Health Organ*, 78, 920-929.

Thomsen, M. S., El-Sayed, M., & Mikkelsen, J. D. (2011). Differential immediate and sustained memory enhancing effects of alpha7 nicotinic receptor agonists and allosteric modulators in rats. *PLoS.One.*, 6, e27014.

Tietje, K. R., Anderson, D. J., Bitner, R. S., Blomme, E. A., Brackemeyer, P. J., Briggs, C. A., Browman, K. E., Bury, D., Curzon, P., Drescher, K. U., Frost, J. M., Fryer, R. M., Fox, G. B., Gronlien, J. H., Hakerud, M., Gubbins, E. J., Halm, S., Harris, R., Helfrich, R. J., Kohlhaas, K. L., Law, D., Malysz, J., Marsh, K. C., Martin, R. L., Meyer, M. D., Molesky, A. L., Nikkel, A. L., Otte, S., Pan, L., Puttfarcken, P. S., Radek, R. J., Robb, H. M., Spies, E., Thorin-Hagene, K., Waring, J. F., Ween, H., Xu, H., Gopalakrishnan, M., & Bunnelle, W. H. (2008). Preclinical characterization of A-582941: a novel alpha7 neuronal nicotinic receptor agonist with broad spectrum cognition-enhancing properties. *CNS.Neurosci.Ther.*, 14, 65-82.

Tonstad, S. (2006). Smoking cessation efficacy and safety of varenicline, an alpha4beta2 nicotinic receptor partial agonist. *J.Cardiovasc.Nurs.*, 21, 433-436.

Truett, G. E., Heeger, P., Mynatt, R. L., Truett, A. A., Walker, J. A., & Warman, M. L. (2000). Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *Biotechniques*, 29, 52, 54.

Turner, J. R., Castellano, L. M., & Blendy, J. A. (2011). Parallel anxiolytic-like effects and upregulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors following chronic nicotine and varenicline. *Nicotine.Tob.Res.*, 13, 41-46.

- Turner, P. R., O'Connor, K., Tate, W. P., & Abraham, W. C. (2003). Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog.Neurobiol.*, 70, 1-32.
- Uchida, S., Takeyasu, K., Matsuda, T., & Yoshida, H. (1979). Changes in muscarinic acetylcholine receptors of mice by chronic administrations of diisopropylfluorophosphate and papaverine. *Life Sci.*, 24, 1805-1812.
- Uematsu, M., Ohara, Y., Navas, J. P., Nishida, K., Murphy, T. J., Alexander, R. W., Nerem, R. M., & Harrison, D. G. (1995). Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am.J.Physiol.*, 269, C1371-C1378.
- Vallejo, Y. F., Buisson, B., Bertrand, D., & Green, W. N. (2005). Chronic nicotine exposure upregulates nicotinic receptors by a novel mechanism. *J.Neurosci.*, 25, 5563-5572.
- Van Kampen, M., Selbach, K., Schneider, R., Schiegel, E., Boess, F., & Schreiber, R. (2004). AR-R 17779 improves social recognition in rats by activation of nicotinic alpha7 receptors. *Psychopharmacology (Berl)*, 172, 375-383.
- van Praag, H. (2008). Neurogenesis and exercise: past and future directions. *Neuromolecular.Med.*, 10, 128-140.
- van Praag, H. (2009). Exercise and the brain: something to chew on. *Trends Neurosci.*, 32, 283-290.
- van Praag, H., Christie, B. R., Sejnowski, T. J., & Gage, F. H. (1999). Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 96, 13427-13431.
- van Praag, H., Shubert, T., Zhao, C., & Gage, F. H. (2005). Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J.Neurosci.*, 25, 8680-8685.
- Vaynman, S., Ying, Z., & Gomez-Pinilla, F. (2004a). Exercise induces BDNF and synapsin I to specific hippocampal subfields. *J.Neurosci.Res.*, 76, 356-362.
- Vaynman, S., Ying, Z., & Gomez-Pinilla, F. (2004b). Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *Eur.J.Neurosci.*, 20, 2580-2590.
- Vaynman, S. S., Ying, Z., Yin, D., & Gomez-Pinilla, F. (2006). Exercise differentially regulates synaptic proteins associated to the function of BDNF. *Brain Res.*, 1070, 124-130.
- Villablanca, A. C. (1998). Nicotine stimulates DNA synthesis and proliferation in vascular endothelial cells in vitro. *J.Appl.Physiol.*, 84, 2089-2098.
- Voss, M. W., Nagamatsu, L. S., Liu-Ambrose, T., & Kramer, A. F. (2011). Exercise, brain, and cognition across the life span. *J.Appl.Physiol.*, 111, 1505-1513.
- Walsh, D. M. & Selkoe, D. J. (2007). A beta oligomers - a decade of discovery. *J.Neurochem.*, 101, 1172-1184.

- Wang, S. H. & Morris, R. G. (2010). Hippocampal-neocortical interactions in memory formation, consolidation, and reconsolidation. *Annu.Rev.Psychol.*, 61, 49-4.
- Waterhouse, E. G. & Xu, B. (2009). New insights into the role of brain-derived neurotrophic factor in synaptic plasticity. *Mol.Cell Neurosci.*, 42, 81-89.
- Werkheiser, J. L., Sydserff, S., Hubbs, S. J., Ding, M., Eisman, M. S., Perry, D., Williams, A. J., Smith, J. S., Mrzljak, L., & Maier, D. L. (2011). Ultra-low exposure to alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor partial agonists elicits an improvement in cognition that corresponds with an increase in alpha-7 receptor expression in rodents: implications for low dose clinical efficacy. *Neuroscience*, 186, 76-87.
- West, R., Zatonski, W., Cedzynska, M., Lewandowska, D., Pazik, J., Aveyard, P., & Stapleton, J. (2011). Placebo-controlled trial of cytisine for smoking cessation. *N.Engl.J.Med.*, 365, 1193-1200.
- Weuve, J., Kang, J. H., Manson, J. E., Breteler, M. M., Ware, J. H., & Grodstein, F. (2004). Physical activity, including walking, and cognitive function in older women. *JAMA*, 292, 1454-1461.
- Whishaw, I. Q. & Tomie, J. (1996). Of mice and mazes: similarities between mice and rats on dry land but not water mazes. *Physiol Behav.*, 60, 1191-1197.
- Whiteaker, P., Sharples, C. G., & Wonnacott, S. (1998). Agonist-induced up-regulation of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors in M10 cells: pharmacological and spatial definition. *Mol.Pharmacol.*, 53, 950-962.
- Whitehouse, P. J., Price, D. L., Struble, R. G., Clark, A. W., Coyle, J. T., & Delon, M. R. (1982). Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science*, 215, 1237-1239.
- Williams, R. L., Risau, W., Zerwes, H. G., Drexler, H., Aguzzi, A., & Wagner, E. F. (1989). Endothelioma cells expressing the polyoma middle T oncogene induce hemangiomas by host cell recruitment. *Cell*, 57, 1053-1063.
- Winter, B., Breitenstein, C., Mooren, F. C., Voelker, K., Fobker, M., Lechtermann, A., Krueger, K., Fromme, A., Korsukewitz, C., Floel, A., & Knecht, S. (2007). High impact running improves learning. *Neurobiol.Learn.Mem.*, 87, 597-609.
- Winters, B. D. & Bussey, T. J. (2005). Removal of cholinergic input to perirhinal cortex disrupts object recognition but not spatial working memory in the rat. *Eur.J.Neurosci.*, 21, 2263-2270.
- Winters, B. D., Forwood, S. E., Cowell, R. A., Saksida, L. M., & Bussey, T. J. (2004). Double dissociation between the effects of peri-postrhinal cortex and hippocampal lesions on tests of object recognition and spatial memory: heterogeneity of function within the temporal lobe. *J.Neurosci.*, 24, 5901-5908.
- Winters, B. D., Saksida, L. M., & Bussey, T. J. (2008). Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neurosci.Biobehav.Rev.*, 32, 1055-1070.

- Wonnacott, S. (1990). The paradox of nicotinic acetylcholine receptor upregulation by nicotine. *Trends Pharmacol.Sci.*, 11, 216-219.
- Wonnacott, S. (1997). Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci.*, 20, 92-98.
- Wonnacott, S., Drasdo, A., Sanderson, E., & Rowell, P. (1990). Presynaptic nicotinic receptors and the modulation of transmitter release. *Ciba Found.Symp.*, 152, 87-101.
- Woolley, M. L., Marsden, C. A., Sleight, A. J., & Fone, K. C. (2003). Reversal of a cholinergic-induced deficit in a rodent model of recognition memory by the selective 5-HT6 receptor antagonist, Ro 04-6790. *Psychopharmacology (Berl)*, 170, 358-367.
- Wrenn, C. C. & Wiley, R. G. (1998). The behavioral functions of the cholinergic basal forebrain: lessons from 192 IgG-saporin. *Int.J.Dev.Neurosci.*, 16, 595-602.
- Xiao, C., Nashmi, R., McKinney, S., Cai, H., McIntosh, J. M., & Lester, H. A. (2009). Chronic nicotine selectively enhances alpha4beta2\* nicotinic acetylcholine receptors in the nigrostriatal dopamine pathway. *J.Neurosci.*, 29, 12428-12439.
- Xiao, Y. & Kellar, K. J. (2004). The comparative pharmacology and up-regulation of rat neuronal nicotinic receptor subtype binding sites stably expressed in transfected mammalian cells. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 310, 98-107.
- Yaffe, K., Barnes, D., Nevitt, M., Lui, L. Y., & Covinsky, K. (2001). A prospective study of physical activity and cognitive decline in elderly women: women who walk. *Arch.Intern.Med.*, 161, 1703-1708.
- Yao, M., Nguyen, T. V., & Pike, C. J. (2005). Beta-amyloid-induced neuronal apoptosis involves c-Jun N-terminal kinase-dependent downregulation of Bcl-w. *J.Neurosci.*, 25, 1149-1158.
- Yates, S. L., Bencherif, M., Fluhler, E. N., & Lippiello, P. M. (1995). Up-regulation of nicotinic acetylcholine receptors following chronic exposure of rats to mainstream cigarette smoke or alpha 4 beta 2 receptors to nicotine. *Biochem.Pharmacol.*, 50, 2001-2008.
- Yu, W. F., Nordberg, A., Ravid, R., & Guan, Z. Z. (2003). Correlation of oxidative stress and the loss of the nicotinic receptor alpha 4 subunit in the temporal cortex of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci.Lett.*, 338, 13-16.
- Zafra, F., Hengerer, B., Leibrock, J., Thoenen, H., & Lindholm, D. (1990). Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. *EMBO J.*, 9, 3545-3550.
- Zamani, M. R., Allen, Y. S., Owen, G. P., & Gray, J. A. (1997). Nicotine modulates the neurotoxic effect of beta-amyloid protein(25-35) in hippocampal cultures. *Neuroreport*, 8, 513-517.
- Zaniewska, M., McCreary, A. C., Stefanski, R., Przegalinski, E., & Filip, M. (2008). Effect of varenicline on the acute and repeated locomotor responses to nicotine in rats. *Synapse*, 62, 935-939.

Zayas, R. M., Qazi, S., Morton, D. B., & Trimmer, B. A. (2002). Nicotinic-acetylcholine receptors are functionally coupled to the nitric oxide/cGMP-pathway in insect neurons. *J.Neurochem.*, 83, 421-431.

Zhang, J., Rui, Y. C., Yang, P. Y., Lu, L., & Li, T. J. (2006). C-reactive protein induced expression of adhesion molecules in cultured cerebral microvascular endothelial cells. *Life Sci.*, 78, 2983-2988.

Zhang, Y., Lu, X., & Bhavnani, B. R. (2003). Equine estrogens differentially inhibit DNA fragmentation induced by glutamate in neuronal cells by modulation of regulatory proteins involved in programmed cell death. *BMC.Neurosci.*, 4, 32.

Zhu, X., Lee, H. G., Casadesus, G., Avila, J., Drew, K., Perry, G., & Smith, M. A. (2005). Oxidative imbalance in Alzheimer's disease. *Mol.Neurobiol.*, 31, 205-217.

Zhu, X., Smith, M. A., Honda, K., Aliev, G., Moreira, P. I., Nunomura, A., Casadesus, G., Harris, P. L., Siedlak, S. L., & Perry, G. (2007). Vascular oxidative stress in Alzheimer disease. *J.Neurol.Sci.*, 257, 240-246.

## Lebenslauf und Publikationen

**Charlotte Both**

**geboren am 10.08.1984**

- Juni 2003 Abitur am Elisabeth-von-Thüringen Gymnasium Köln
- Oktober 2003-April 2008 Pharmaziestudium an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Mai 2008-Januar 2009 Aufbaustudium Diplom-Pharmazie im Fachbereich Pharmakologie und Toxikologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Thema der Diplomarbeit: *„Epitopabhängigkeit der Bindung von mit Gallamin und Tacrin verwandten allosterischen Hybridmodulatoren an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren“*
- Mai 2009 Diplomprüfung zur Diplom-Pharmazeutin
- Februar 2009-Juli 2009 Pharmaziepraktikantin in der Potsdamer-Platz-Apotheke in Berlin
23. Oktober 2009 Approbation als Apothekerin
- Seit Februar 2010 Promotionsstudium unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Kojda am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Seit 2011 Weiterbildung zur Fachapothekerin für Arzneimittelinformation

### Kurse:

Versuchstierkundliche Einführung für wissenschaftliche und technische Mitarbeiter, Doktoranden und Studenten zum Erwerb des Fachkundenachweises gem § 9 des geltenden Tierschutzgesetzes. Tierversuchsanlage Universitätsklinikum Düsseldorf.

**Originalarbeiten:**

Dao VT, Floeren M, Kumpf S, **Both C**, Peter B, Balz V, Suvorava T, Kojda G (2011). Catalase activity prevents exercise-induced up-regulation of vasoprotective proteins in venous tissue. *J Cell Mol Med* 15(11): 2326-2334.

**Übersichts- und Fortbildungsartikel:**

**Both C** (2010). Romiplostim zur Behandlung der immun- (idiopathischen) thrombozytopenischen Purpura (ITP). *Fortbildungstelegramm Pharmazie* 3:130-144.

[http://www.uni-duesseldorf.de/kojda-pharmalehrbuch/FortbildungstelegrammPharmazie/Fortbildungsartikel/Romiplostim\\_fuer\\_FortePharm\\_2010.pdf](http://www.uni-duesseldorf.de/kojda-pharmalehrbuch/FortbildungstelegrammPharmazie/Fortbildungsartikel/Romiplostim_fuer_FortePharm_2010.pdf)

**Both C**, Bas M, Wendland R, Kojda, G (2011). Nichtallergisches Angioödem. Nebenwirkung von ACE-Hemmern. *Pharmazeutische Zeitung*, 156 (34), 14-19.  
<http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=39069>

**Both C** (2012). Prognostische Pharmakotherapie nach akutem Koronarsyndrom. Clopidogrel bekommt Konkurrenz: Ticagrelor. *Fortbildungstelegramm Pharmazie* 6(4): 127-141.

[http://www.uni-duesseldorf.de/kojda-pharmalehrbuch/FortbildungstelegrammPharmazie/Fortbildungsartikel/Ticagrelor\\_fuer\\_FortePharm\\_2012.pdf](http://www.uni-duesseldorf.de/kojda-pharmalehrbuch/FortbildungstelegrammPharmazie/Fortbildungsartikel/Ticagrelor_fuer_FortePharm_2012.pdf)

**Both C**, Kojda G (2012). Vorhofflimmern: Der Thromboembolie vorbeugen. *Pharmazeutische Zeitung* 157(15):16-24.

<http://www.pharmazeutische-zeitung.de/?id=41567>

**Both C**, Pick S (2013). Austauschbarkeit von Augentropfen zur Glaukomtherapie. *Fortbildungstelegramm Pharmazie* 7(3): 92-111.

[http://www.uni-duesseldorf.de/kojda-pharmalehrbuch/FortbildungstelegrammPharmazie/Fortbildungsartikel/Antiglaukomatosa\\_fuer\\_FortePharm\\_2013.pdf](http://www.uni-duesseldorf.de/kojda-pharmalehrbuch/FortbildungstelegrammPharmazie/Fortbildungsartikel/Antiglaukomatosa_fuer_FortePharm_2013.pdf)

**Both C**, Kojda G, Lange-Asschenfeldt, C (2013). Pharmacotherapy of generalized anxiety disorder: focus and update on pregabalin. *Expert Rev of Neurother*, in press

## **Danksagung**

Ogleich dieses Kapitel die letzte Seite meiner Dissertationsarbeit füllt, ist es wohl eines der wichtigsten. Denn nach Jahren intensiver Arbeit ist es nun an der Zeit, mich bei den Personen zu bedanken, die mich bis zum Ende meiner Promotion begleitet und unterstützt haben.

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Kojda für die Überlassung des interessanten Themas und die konstruktive Betreuung über die vergangenen Jahre bedanken. Ihm gilt mein besonderer Dank aufgrund seiner stetigen Förderung meines beruflichen und persönlichen Werdeganges.

Für die bereitwillige Übernahme der Mitbetreuung der Arbeit und des Zweitgutachtens danke ich Herrn Prof. Dr. Proksch. Herrn PD Dr. Lange-Asschenfeldt gilt mein Dank aufgrund der stets guten Zusammenarbeit und der Möglichkeit der Nutzung des Forschungslabors Neurobiochemie des LVR-Klinikums Düsseldorf. Mein Dank geht auch an Herrn Dr. Uwe Henning aus dem Forschungslabor Neurobiochemie für seine Einführung in die Zellkultivierung und seine bereichernden Diskussionsbeiträge. Frau Dr. Sandra Schäble aus dem Institut für experimentelle Psychologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf half mir bei allen Fragen zur Durchführung von Offenfeldversuchen. Bei meiner Arbeitsgruppe möchte ich mich bedanken für die Erfahrungen, die ich in der vergangenen Zeit machen durfte und die mich in meiner persönlichen Weiterentwicklung prägten. Besonders danke ich Tanya für ihre stets hilfreichen und konstruktiven Ratschläge.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die den Grundstein für meinen Werdegang gelegt haben. Ihre liebevolle Fürsorge und moralische Unterstützung haben mir stets weitergeholfen. Dankbar bin ich auch meinen Brüdern Leonard und Viktor, die mir stets Mut zusprachen, sowie meinem Freund Christian, dessen Verständnis und Nachsicht ich mir immer sicher sein konnte. Diese Arbeit ist ihm gewidmet.