



# AMPC i neuroinflamació: Identificació de proteïnes implicades en la regulació dels nivells d'AMPC en l'encefalomielitis autoimmune experimental

Cristina Sanabra Palau

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



# **AMPc i neuroinflamació: Identificació de proteïnes implicades en la regulació dels nivells d'AMPc en l'encefalomielitis autoimmune experimental**

Departament de Neuroquímica i Neurofarmacologia, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS)

Memòria presentada per optar al grau de Doctor en Biologia per la Universitat de Barcelona, dins del Programa de Doctorat en Biomedicina (Departament de Neurociències, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona)

El doctorand:

La directora:

**Cristina Sanabra Palau**

**Dr. Guadalupe Mengod Los Arcos**  
Professora d'Investigació del CSIC



# INTRODUCCIÓ

---

<b>1. AMPc</b>	<b>2</b>
<b>1.1. VIES DE SENYALITZACIÓ DE L'AMPc</b>	<b>3</b>
1.1.1. RECEPTORS ACOBLATS A PROTEÏNA G	3
1.1.2. PROTEÏNES G	4
1.1.3. SISTEMES EFECTORS DE L'AMPc	5
<u>1.1.3.1. Proteïna cinasa A</u>	5
<u>1.1.3.2. cAMP response element binding protein (CREB)</u>	6
<u>1.1.3.3. Factor intercanviador de nucleòtids de guanina (GEFs)</u>	6
<u>1.1.3.4. Canals iònics dependents de nucleòtids cíclics</u>	7
<b>1.2. COMPARTIMENTALITZACIÓ DE LA SENYAL D'AMPc</b>	<b>7</b>
<b>2. ADENILAT CICLASES</b>	<b>10</b>
<b>2.1. MECANISMES DE REGULACIÓ DE LES ADENILAT CICLASES</b>	<b>12</b>
2.1.1. REGULACIÓ PER PROTEÏNES G HETEROTRIMÈRIQUES	12
2.1.2. REGULACIÓ PER Ca <sup>2+</sup> I CALMODULINA	12
2.1.3. REGULACIÓ PER PROTEÏNES CINASES	13
2.1.4. ACTIVACIÓ PER FORSKOLINA	13
<b>2.2. ADENILAT CICLASES I FUNCIO CEREBRAL</b>	<b>13</b>
2.2.1. PLASTICITAT SINÀPTICA I MEMÒRIA	13
2.2.2. PLASTICITAT SINÀPTICA RELACIONADA AMB EL DOLOR	14
2.2.3. EXCITOTOXICITAT I NEURODEGENERACIÓ	15
2.2.4. FUNCIONS MOTORES	15



<b>2.2.5. DROGODEPENDÈNCIA</b>	<b>15</b>
<u>2.2.5.1. Morfina</u>	15
<u>2.2.5.2. Etanol</u>	16
<b>2.3. ADENILAT CICLASES I SISTEMA OLFACTIU</b>	<b>16</b>
<b>2.4. ADENILAT CICLASES I FUNCIO CARDÍACA</b>	<b>16</b>
<b>2.5. ADENILAT CICLASES I DIFERENCIACIO CEL·LULAR</b>	<b>17</b>
<b>2.6. ADENILAT CICLASES I FUNCIO ESPERMÀTICA</b>	<b>17</b>
<b>2.7. ADENILAT CICLASES COM A DIANA FARMACOLÒGICA</b>	<b>17</b>
<b>3. FOSFODIESTERASES</b>	<b>19</b>
<b>3.1. CLASSIFICACIO I NOMENCLATURA DE LES PDES</b>	<b>19</b>
<b>3.2. ESTRUCTURA MOLECULAR DE LES PDES</b>	<b>21</b>
<b>3.3. PDES COM A DIANA FARMACOLÒGICA</b>	<b>22</b>
<b>3.4. SUPERFAMÍLIA DE LES PDES</b>	<b>23</b>
3.4.1. FAMÍLIA PDE1	23
3.4.2. FAMÍLIA PDE2	24
3.4.3. FAMÍLIA PDE3	25
3.4.4. FAMÍLIA PDE4	25
<u>3.4.4.1. Estructura de les PDE4</u>	26
<u>3.4.4.2. Regulació per PKA</u>	27
<u>3.4.4.3. Regulació per ERK-MAPK</u>	28
<u>3.4.4.4. PDE4 i Complexes de Senyalització</u>	28
3.4.4.4.1. Arrestina	28
3.4.4.4.2. AKAPs	29

	<i>Índex</i>
<u>3.4.4.5. Distribució tissular</u>	29
<u>3.4.4.6. Paper fisiològic de les PDE4</u>	30
<i>3.4.4.6.1. PDE4s en la Resposta Inflamatòria</i>	30
3.4.5. FAMÍLIA PDE5	32
3.4.6. FAMÍLIA PDE6	33
3.4.7. FAMÍLIA PDE7	34
3.4.8. FAMÍLIA PDE8	35
3.4.9. FAMÍLIA PDE9	35
3.4.10. FAMÍLIA PDE10	36
3.4.11. FAMÍLIA PDE11	36
<b>4. EL SISTEMA IMMUNE</b>	<b>38</b>
<b>4.1. IMMUNITAT INNATA</b>	<b>40</b>
4.1.1. PATRONS DE REONEIXEMENT EN EL SISTEMA IMMUNE INNAT	41
<u>4.1.1.1. Receptors Toll-like (TLRs)</u>	41
<i>4.1.1.1.1. Via dependent de MyD88</i>	41
<i>4.1.1.1.2. Via independent de MyD88</i>	43
4.1.2. RESPOSTA IMMUNE INNATA INDUÏDA EN LA RESPOSTA INFLAMATÒRIA	43
<b>4.2. IMMUNITAT ADAPTATIVA</b>	<b>46</b>
4.2.1. ACTIVACIÓ DE LES CÈL·LULES T PER LES APCS	48
<u>4.2.1.1. Cèl·lules T CD8 citotòxiques</u>	50
<u>4.2.1.2. Cèl·lules Th1</u>	50
<u>4.2.1.3. Cèl·lules Th2</u>	51
<u>4.2.1.4. Cèl·lules Th17</u>	51

<u>4.2.1.5. Cèl·lules Tregs</u>	51
4.2.2. MEMÒRIA IMMUNOLÒGICA	52
<b>5. L'AMPc EN LA RESPOSTA IMMUNE</b>	<b>53</b>
5.1. AMPc I LA RESPOSTA IMMUNE INNATA	54
5.2. AMPc I LA RESPOSTA IMMUNE ADAPTATIVA	55
<b>6. LA RESPOSTA NEUROIMMUNE</b>	<b>57</b>
<b>7. ESCLEROSIS MÚLTIPLE I EAE</b>	<b>58</b>
7.1. ESCLEROSIS MÚLTIPLE	58
7.2. LA RESPOSTA IMMUNE EN EL MODEL ANIMAL D'EAE	59
7.2.1. IMMUNITAT ADAPTATIVA	60
<u>7.2.1.1. Cèl·lules Th1</u>	60
<u>7.2.1.2. Cèl·lules Th17</u>	61
<u>7.2.1.3. Cèl·lules T-reg</u> s	63
7.2.2. IMMUNITAT INNATA	64
<u>7.2.2.1. Receptors Toll-like (TLRs)</u>	64
<u>7.2.2.2. Cèl·lules Dendrítiques (DCs)</u>	65
<u>7.2.2.3. Macròfags / Micròglia</u>	65
<u>7.2.2.4. Astròcits</u>	67
<b>OBJECTIUS</b>	<b>71</b>

<b>1. OBTENCIÓ DELS TEIXITS</b>	<b>73</b>
<b>1.1. MODELS ANIMALS UTILITZATS</b>	<b>73</b>
1.1.1. MODEL D'ENCEFALITIS AUTOIMMUNE EXPERIMENTAL (EAE)	73
<b>1.2. PREPARACIÓ DEL TEIXIT</b>	<b>74</b>
<b>2. TÈCNIQUES I MÈTODES EXPERIMENTALS</b>	<b>75</b>
<b>2.1. HIBRIDACIÓ <i>IN SITU</i></b>	<b>75</b>
2.1.1. HIBRIDACIÓ <i>IN SITU</i> AMB OLIGONUCLEÒTIDS	75
<u>2.1.1.1. Sondes de DNA</u>	75
<u>2.1.1.2. Hibridació <i>in situ</i> radioactiva</u>	76
<i>2.1.1.2.1. Marcatge radioactiu dels oligonucleòtids</i>	76
<i>2.1.1.2.2. Purificació de les sondes marcades</i>	76
<i>2.1.1.2.3. Preparació del teixit</i>	76
<i>2.1.1.2.4. Hibridació del teixit</i>	77
<i>2.1.1.2.5. Rentats</i>	77
<i>2.1.1.2.6. Exposició i obtenció dels autorradiogrames</i>	77
<i>2.1.1.2.7. Controls d'especificitat</i>	78
<b>2.2. qRT-PCR o PCR SEMIQUANTITATIVA DE TRANSCRIPCIÓ INVERSA</b>	<b>79</b>
2.2.1. EXTRACCIÓ DE L'ARN DE LES MEDUL·LES ESPINALS CERVICALS	79
2.2.2. RT-PCR	80
<b>2.3. IMMUNOHISTOQUÍMICA</b>	<b>82</b>
2.3.1. PREPARACIÓ DEL TEIXIT	82
2.3.2. ANTICOSSOS UTILITZATS	82

<i>Índex</i>	
2.3.3. PROTOCOL D'IMMUNOHISTOQUÍMICA	83
<u>2.3.3.1. Revelat amb DAB</u>	83
<u>2.3.3.2. Immunofluorescència</u>	83
<b>2.4. TINCIONS HISTOLÒGIQUES</b>	<b>84</b>
2.4.1. VIOLETA DE CRESIL (TINCIÓ DE NISSEL)	84
2.4.2. LUXOL FAST BLUE	84
2.4.3. FLUOROJADE B	84
<b>2.5. ESTIMULACIÓ DE LEUCÒCITS IN VITRO I ELISA</b>	<b>85</b>
2.5.1. ESTIMULACIÓ DE LEUCÒCITS IN VITRO AMB MOG35-55	85
2.5.2. DETECCIÓ DE CITOCINES PER ELISA	85
<b>2.6. ANÀLISIS DELS RESULTATS</b>	<b>86</b>
2.6.1. HIBRIDACIÓ IN SITU RADIOACTIVA	86
2.6.2. IMMUNOHISTOQUÍMICA	86
2.6.3. PREPARACIÓ DE LES FIGURES	86
2.6.4. AMPLIFICACIÓ PER RT-PCR	86
2.6.5. DETECCIÓ DE CITOCINES PER ELISA	87

## *RESULTATS*

---

<b>1. Estudi del model animal d'EAE en ratolins wildtype</b>	<b>89</b>
<b>2. Canvis en l'expressió de l'ARNm de les PDE de la família 4 en el model EAE en ratolins wildtype</b>	<b>94</b>

**3. Canvis en l'expressió de la proteïna PDE4B en el model EAE en ratolins wildtype** 99

**4. Identificació dels tipus cel·lulars que sobreexpressen l'isoforma PDE4B en el model EAE en ratolins wildtype** 103

**5. Estudi del model EAE en ratolins knockout per a PDE4A i PDE4B** 105

## *DISCUSSIÓ*

---

**1. El model d'EAE en ratolins wildtype** 113

**2. Canvis d'expressió de PDE4 en el model d'EAE** 114

**3. Expressió de PDE4B en el model d'EAE** 115

**4. Tipus cel·lulars que expressen PDE4B en model d'EAE** 116

**5. El model EAE en ratolins knockout per PDE4A i PDE4B** 117

*CONCLUSIONS* 124

---

*BIBLIOGRAFIA* 127

---

*APÈNDIX* 154

---

# ***Introducció***

Cada cèl·lula en un organisme pluricel·lular ha estat programada durant el desenvolupament per respondre a tota una sèrie de senyals extracel·lulars generats per altres cèl·lules. Aquests senyals actuen mitjançant múltiples combinacions per tal de regular el comportament de la cèl·lula.

La senyalització cel·lular es compon no només de senyals extracel·lulars, sinó també d'una sèrie de proteïnes receptores capaces d'unir i respondre de forma característica a molècules senyalitzadores. La majoria de receptors que existeixen són receptors cel·lulars de membrana, amb 3 famílies majoritàries que els conformen: receptors acoblats a canals iònics, receptors acoblats a proteïna G i receptors acoblats a proteïnes enzimàtiques. Un cop activats, els receptors generen una senyal intracel·lular mitjançant l'activació de diverses vies de senyalització intracel·lular.

Les cèl·lules diana poden utilitzar una gran varietat de mecanismes intracel·lulars per tal de respondre específicament als senyals extracel·lulars rebuts.

En aquest treball ens centrarem en una d'aquestes molècules de senyalització intracel·lular, l'adenosina 3',5'-monofosfat cíclica o AMPc, en els receptors encarregats d'activar la seva producció, dels senyals extracel·lulars que activen aquests receptors, dels enzims encarregats de regular la seva síntesi i degradació i d'algunes de les diverses vies de senyalització intracel·lular que poden estar modulades per l'AMPc durant la resposta immune.

## **1.AMPc**

L'AMPc és un missatger secundari identificat per primer cop com a mediador intracel·lular als anys 50 (Sutherland and Rall 1958). Des de llavors s'ha vist involucrat com a missatger secundari en totes les cèl·lules procariotes i animals estudiades.

Els primers estudis d'Earl Sutherland i col·laboradors sobre la glicogènesis produïda per l'adrenalina van establir grans avanços en l'estudi de l'activació hormonal de la glicogen fosforilasa. D'aquests treballs (Berthet et al. 1956; Rall et al. 1956) es va poder concloure que l'activació per l'hormona generava un factor activador termoestable, un nou ribonucleòtid d'adenina, l'AMPc. Va costar molt acceptar l'AMPc i el concepte de missatger secundari, però a partir dels anys 70, amb l'arribada de noves tècniques per determinar els nivells d'AMPc, hi va haver un augment d'interès en aquestes molècules.



La concentració basal d'AMPc dins la cèl·lula es troba als voltants de  $10^{-7}$  M, però una senyal extracel·lular pot provocar un augment dels nivells d'AMPc intracel·lulars de més de 20 vegades en tan sols segons. Per tal que es generi una resposta tan ràpida, es requereix un balanç altament regulat entre la síntesi i la degradació de la molècula. Aquesta regulació la duen a terme dues famílies d'enzims: les adenilat ciclases, enzims encarregats de la síntesi de l'AMPc a partir d'ATP, i les fosfodiesterases d'AMPc, enzims que hidrolitzen l'AMPc a 5'-AMP.

Com que aquestes proteïnes són una part central d'aquest treball, seran tractats amb més detall en capítols posteriors.

Moltes molècules de senyalització extracel·lular actuen incrementant els nivells d'AMPc, i ho fan bàsicament estimulant l'activitat de les adenilat ciclases més que inhibint l'activitat de les fosfodiesterases.

L'AMPc està implicat en el mecanisme d'acció i en els processos de transducció de senyal de múltiples molècules com són hormones, neurotransmissors, citocines i factors de creixement. Degut a la gran varietat de molècules que senyalitzen a través de l'AMPc, aquest missatger secundari és clau en processos diversos com la contracció muscular, l'exocitosi, processos metabòlics, neurotransmissió, creixement, agregació de plaquetes, diferenciació cel·lular, transformació de fibroblasts, síntesis d'esteroides a l'ovari, mobilització de la glucosa al fetge o desenvolupament embrionari (Houslay 1998).

### **1.1. VIES DE SENYALITZACIÓ DE L'AMPC**

#### **1.1.1. RECEPTORS ACOBLATS A PROTEÏNA G**

Els receptors acoblats a proteïna G conformen la més àmplia família de receptors cel·lulars de membrana. Aquests receptors intervenen en la resposta cel·lular a una gran varietat de molècules senyalitzadores, incloent hormones, neurotransmissors i d'altres mediadors locals. Aquestes molècules que els activen poden ser molt variades, des de proteïnes i pèptids, passant per derivats d'aminoàcids, fins a àcids grassos, llum, olors, etc.

Malgrat la diversitat estructural i funcional de les molècules que s'hi uneixen, tots els receptors acoblats a proteïna G presenten una estructura força similar. Consisteix en una única cadena polipeptídica amb set dominis transmembranals. L'extrem amino es situa a l'exterior de la cèl·lula, mentre que el carboxil el trobem a l'interior. Tots utilitzen la mateixa

regió intracitoplasmàtica per interaccionar amb la proteïna G un cop s'uneix el lligand extracel·lular, la que uneix els segments transmembranals 5 i 6 (Gilman 1987).

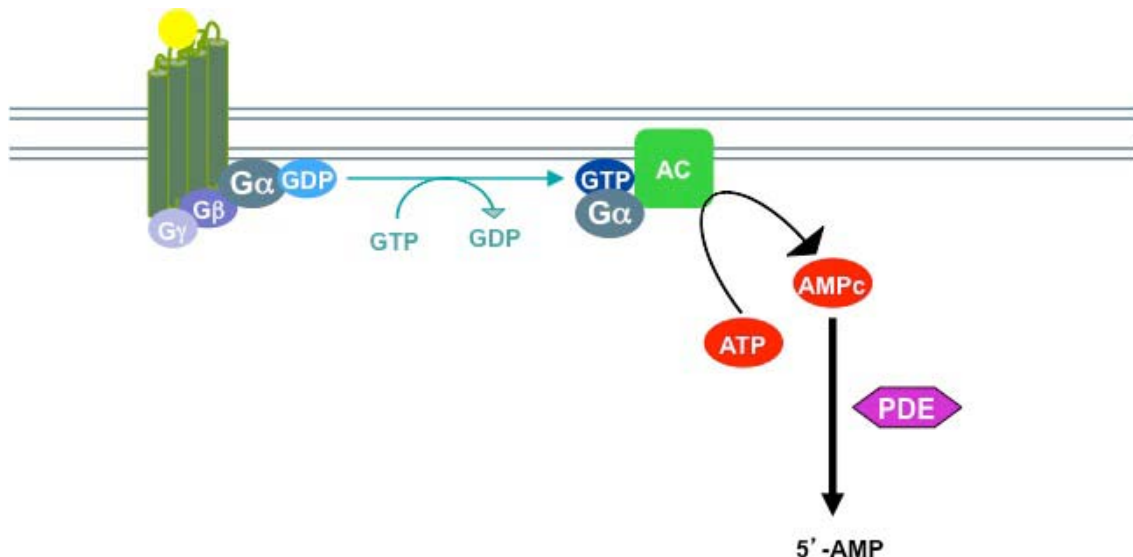
Quan els lligands extracel·lulars s'uneixen a aquests receptors es produeix un canvi conformacional que porta a l'activació de les proteïnes trimèriques unides a GTP o proteïnes G. Aquestes proteïnes, ancorades a la part citoplasmàtica del receptor, on actuen com a connectors entre els receptors i els enzims o canals iònics. Hi ha diversos tipus de proteïnes G, cadascuna específica per un grup concret de receptors transmembranals i per un grup concret de proteïnes de senyalització intracel·lular. No obstant, totes presenten la mateixa estructura i actuen de forma similar (Wettschureck and Offermanns 2005).

### 1.1.2. PROTEÏNES G

Les proteïnes G estan formades per 3 subunitats proteiques,  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ . En estat basal, la subunitat  $\alpha$  uneix GDP i la proteïna es troba inactiva. Quan s'estimula per l'activació del receptor, la subunitat  $\alpha$  allibera el GDP, permetent la unió de GTP en el seu lloc. Aquest intercanvi permet al trímer de dissociar-se en dos components activats: la subunitat  $\alpha$  i el complex  $\beta\gamma$ . La unió de GTP causa un canvi conformacional que permetrà a la subunitat  $\alpha$  interaccionar amb les seves proteïnes diana. El complex  $\beta\gamma$  no canvia de conformació, però la regió que anteriorment quedava emmascarada per la subunitat  $\alpha$  queda llavors exposada per tal d'interaccionar amb un grup diferent de proteïnes diana. Aquestes proteïnes diana poden ser tant enzims com canals iònics localitzats a la membrana plasmàtica.

La subunitat  $\alpha$  és una GTPasa, i una vegada ha hidrolitzat el GTP a GDP, es torna a associar amb el complex  $\beta\gamma$  per formar una proteïna G inactiva, revertint d'aquesta manera el procés d'activació generat per la unió lligand-receptor (**Figura 1**).

Tots els receptors que actuen via AMPc estan acoblats a proteïna G estimuladora ( $G_s$ ), que activa l'adenilat ciclasa i d'aquesta manera produeix un augment de la concentració intracel·lular d'AMPc. Un altre tipus de proteïna G són les proteïnes G inhibidores ( $G_i$ ), que inhibeixen l'adenilat ciclasa, però actuen principalment regulant de forma directa els canals iònics més que disminuint els nivells d'AMPc (Neves et al. 2002).



**Figura 1. Síntesis i degradació de l'AMPc.** Un cop s'ha activat el GPCR, la subunitat  $\alpha$  de la proteïna G es dissocia i activa l'Adenilat Ciclasa (AC). Aquesta produeix AMPc, que podrà ser degradat mitjançant les fosfodiesterases (PDE).

Encara que normalment és la subunitat  $\alpha$  la que regula la ciclasa ( $G_{\alpha s}$  i  $G_{\alpha i}$ ), el complex  $\beta\gamma$  també ho pot fer a vegades, augmentant o disminuint l'activitat de l'enzim, depenent del complex  $\beta\gamma$  i de la isoforma de la ciclasa.

### 1.1.3.SISTEMES EFECTORS DE L'AMPC

#### 1.1.3.1.Proteïna cinasa A

L'AMPc exerceix el seu efecte en la majoria de cèl·lules animals mitjançant l'activació de la proteïna cinasa dependent d'AMPc (PKA). Aquest enzim catalitza la transferència del grup fosfat terminal de l'ATP a serines o treonines específiques de les seves proteïnes diana, regulant d'aquesta manera la seva activitat. Els substrats de la PKA són diferents segons el tipus cel·lular, fet que explica que els efectes de l'AMPc siguin tan variables depenent del tipus de cèl·lula. Un cop les subunitats catalítiques han exercit la seva activitat, són recaptades per les subunitats reguladores i la PKA torna al seu estat basal (Brandon et al. 1997).

En el seu estat inactiu, la PKA consisteix en un complex de dues subunitats catalítiques i dues subunitats reguladores. La unió de l'AMPc a les subunitats reguladores altera la seva conformació, provocant que aquestes es dissociïn del complex. Les subunitats catalítiques alliberades són llavors actives per tal de fosforil·lar molècules substrat específiques.

Les subunitats reguladores també són importants per la localització de la cinasa dins la cèl·lula: les proteïnes d'ancoratge a PKA o AKAPs s'uneixen a les subunitats reguladores i a la membrana o a un component del citoesquelet, fent que el complex enzimàtic es localitzi en un compartiment subcel·lular concret. Algunes d'aquestes proteïnes d'ancoratge també uneixen altres cinases i fosfatases, creant així un complex de senyalització.

Les cèl·lules de mamífers tenen almenys dos tipus de PKAs: les de tipus I es troben principalment al citosol, mentre que les de tipus II són les que s'uneixen a través de les AKAPs a la membrana o al citoesquelet. En ambdós casos, un cop s'alliberen i s'activen les subunitats catalítiques, aquestes poden migrar cap al nucli, on poden fosforil·lar proteïnes de regulació gènica.

#### 1.1.3.2. cAMP response element binding protein (CREB)

Una d'aquestes proteïnes de regulació gènica que pot ser fosforil·lada al nucli és CREB (proteïna d'unió a l'element de resposta a AMPc). A través de la fosforil·lació d'aquesta proteïna o d'altres similars, el senyal d'AMPc és capaç d'activar l'expressió de gens els quals el seu promotor contingui una o diverses seqüències CRE (elements de resposta a AMPc) (Borrelli et al. 1992).

Un cop activada la PKA, les subunitats catalítiques viatgen cap al nucli i fosforil·len un residu de serina de CREB, que s'activa, i s'uneix llavors a seqüències CRE conservades. Un cop fosforil·lat, CREB recluta la proteïna coactivadora CBP (proteïna d'unió a CREB), que estimula la transcripció gènica.

Aquesta via de senyalització controla molts processos de les cèl·lules, des de la síntesis d'hormones a les cèl·lules endocrines fins a la producció de proteïnes clau per la memòria a llarg termini al cervell (Silva et al. 1998).

#### 1.1.3.3. Factor intercanviador de nucleòtids de guanina (GEFs)

Els GEFs són components de les xarxes de senyalització intracel·lular que estimulen l'alliberació de GDP de les GTPases inactives per substituir-lo per GTP i permetre la seva activació. En un principi es creia que les accions de l'AMPc en la fisiologia de la cèl·lula eren degudes tan sols a l'activació de la PKA. Però el descobriment i la caracterització de la família de "sensors" d'AMPc Epac va canviar aquesta idea (Bos 2003). Epac funciona com una proteïna d'unió a AMPc amb activitat GEF intrínseca: Epac aparella la producció d'AMPc amb l'activació de Rap, una GTPasa de baix pes molecular de la família Ras. Els

processos cel·lulars estimulats com a conseqüència de l'activació de Rap mitjançant Epac inclouen l'adhesió cel·lular per integrines (Rangarajan et al. 2003), la formació de la barrera endotelial (Fukuhara et al. 2005), la formació de les unions tipus *gap* al cor (Somekawa et al. 2005), la senyalització a través de MAPK (Gerlo et al. 2006; Wang et al. 2006), l'expressió gènica d'hormones (Gerlo et al. 2006), i l'activació de la fosfolipasa C- $\epsilon$  (PLC- $\epsilon$ ) (Schmidt et al. 2001). Per tant Epac és una proteïna GEF activada directament per AMPc, també anomenada cAMP-GEF. Epac també pot interaccionar amb les GTPases de la família Ras, que es troben unides a membrana (Li et al. 2006). D'aquesta manera podem trobar Epac actuant en microdominis de membrana rics en aquestes GTPases.

### 1.1.3.4. Canals iònics dependents de nucleòtids cíclics

Els receptors olfactors són GPCRs específics i actuen a través de l'AMPc. Al ser estimulats per un odorant, activen una proteïna G específica del sistema olfatiu, que activa l'AC i augmenten els nivells d'AMPc. Aquest increment obre els canals iònics dependents d'AMPc, permetent una entrada de Na<sup>+</sup> que despolaritza la neurona i inicia un impuls nerviós que viatjarà a través de l'axó fins al cervell.

També existeixen canals iònics dependents de GMPc. Aquests els trobem en cèl·lules fotorreceptores, on tenen la funció de traduir els estímuls sensorials lumínics en activitat neuronal (Zufall et al. 1994).

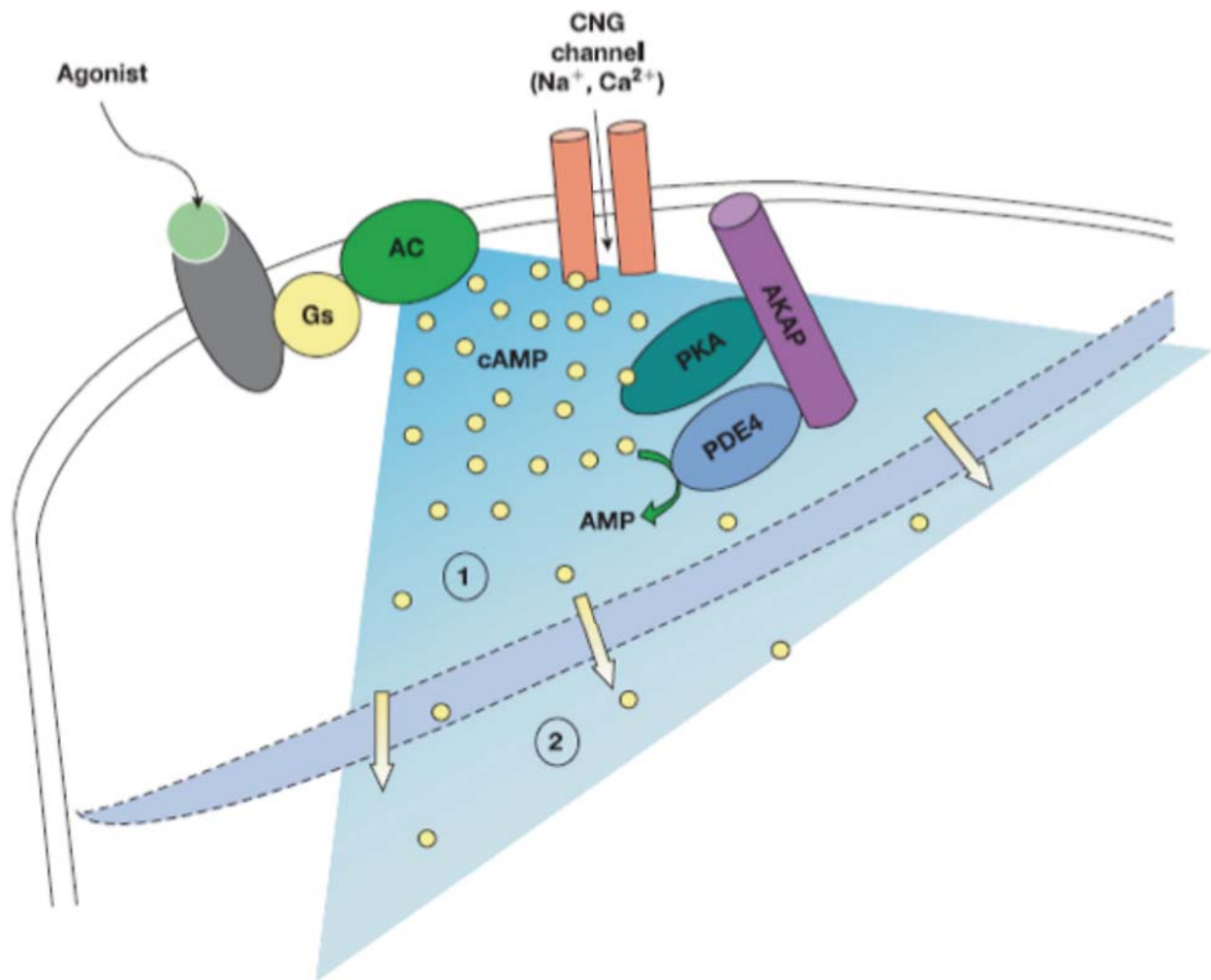
Els canals iònics dependents de nucleòtids cíclics es troben àmpliament distribuïts al SNC i els canvis que generen en els nivells de Ca<sup>+2</sup> intracel·lular podrien implicar-los en la modulació de l'activitat neuronal i la plasticitat sinàptica (Zufall et al. 1997).

## 1.2. COMPARTIMENTALITZACIÓ DE LA SENYAL D'AMPc

La idea de que la senyalització intracel·lular es troba compartimentalitzada va sorgir a principis dels anys 80 d'un treball on s'examinaven les conseqüències funcionals de l'activació de l'AC en cardiomiòcits mitjançant dos GPCRs diferents: el receptor  $\beta$ -adrenèrgic i el receptor de prostaglandina (Hayes et al. 1980). Mentre que la unió d'aquests receptors amb els seus agonistes produïa increments similars en l'AMPc "global", la conseqüència funcional era totalment diferent. Només l'estimulació del receptor  $\beta$ -adrenèrgic un augment de la força i la taxa de contraccions, i l'activació de diverses isoformes de PKA. Això només es podia explicar si la senyal d'AMPc es trobava compartimentalitzada en aquestes cèl·lules.

L'activació de les ACs per GPCRs produeix una generació d'AMPc a la part citosòlica de la membrana plasmàtica. Aquesta producció pot delimitar-se encara més, ja que les ACs les podem trobar localitzades de forma restringida en regions de la membrana plasmàtica. Per exemple, a les caveoles i les densitats post-sinàptiques les ACs i els GPCRs poden estar organitzats per formar complexos espacials i funcionals en certes regions membranals (Willoughby and Cooper 2007).

És molt important per la compartimentalització de la senyal d'AMPc que proteïnes efectores com PKA o Epac siguin captades en complexos intracel·lulars específics, juntament amb les seves proteïnes substrat. El descobriment de la família de proteïnes d'ancoratge AKAPs fou clau per explicar aquest concepte (**Figura 2**). Les AKAPs recluten específicament PKA (Carnegie et al. 2009). Algunes PKAs són espacialment restringides a la cèl·lula a través de la unió amb les AKAPs, juntament amb les seves proteïnes substrat. Això permet que les AKAPs generin complexos de senyalització concrets en una regió espacial que responguin a gradients intracel·lulars d'AMPc definits. Quan les PDEs es troben dins d'aquests complexos o pròximes a ells, l'acció coordinada entre elles i les ACs defineix els nivells i la persistència de la senyal d'AMPc en una localització concreta de la membrana. Algunes AKAPs poden unir de forma addicional altres proteïnes de senyalització com diverses proteïnes cinases, fosfatases, GTPases i proteïnes adaptadores per aportar més estímuls reguladors dins d'aquests complexos (Tasken and Aandahl 2004). A més, algunes AKAPs poden unir-se a GPCRs i ACs, dirigint l'activitat PKA a proteïnes diana associades directament amb la producció d'AMPc.



**Figura 2. Representació d'un microdomini.** Es mostren algunes de les proteïnes implicades en generar aquests micro-ambients d'AMPc que difereixen de la resta de regions del citosol. Les ACs es troben ancorades a la membrana per proteïnes *scaffold* pròximes als canals iònics dependents de nucleòtids cíclics (Fagan et al. 1998). També es creu que hi ha una PDE estimulada per PKA prop de l'activitat ciclasa (Li et al. 1996). Modificat de (Cooper 2003).

## 2.ADENILAT CICLASES

Les Adenilat Ciclases (AC) són els enzims encarregats de convertir l'ATP en AMPc i pirofosfat. Tot i que l'AMPc va ser descobert al voltant del anys 60, la primera AC no es va clonar fins l'any 1989 (Krupinski et al. 1989). Des de llavors s'ha avançat molt en el clonatge, la caracterització i l'anàlisi estructural de cadascuna de les isoformes de les ACs.

Les ACs vénen regulades per proteïnes G acoblades a receptors transmembranals. Per tant, senyals extracel·lulars activaran diversos receptors acoblats a proteïna G que modularan els nivells d'AMPc intracel·lular i portaran a l'activació de diverses vies de senyalització i, finalment, a una resposta cel·lular. Segons les propietats i els nivells d'expressió relatius de cada isoforma en un teixit o cèl·lula concrets, els senyals extracel·lulars rebuts a través dels GPCRs poden ser integrats de forma diferent.

Totes elles comparteixen una gran homologia de seqüència en l'estructura primària del seu domini catalític, així com la mateixa estructura tridimensional predita. Cadascuna de les AC consisteix en dos dominis hidrofòbics (de 6 regions transmembrana cadascun) i dos dominis citoplasmàtics, resultant en una proteïna pseudosimètrica. Només els dominis citoplasmàtics (C1 i C2), que constitueixen el domini catalític, estan subjectes a regulacions intracel·lulars específiques per a cada subtipus d'AC. El domini C1 és important per la formació d'una estructura en forma de *loop* que uneix el pirofosfat al lloc actiu, mentre que el domini C2 juga un paper clau en la unió de la subunitat G $\alpha$  de la proteïna G.

Fins a l'actualitat, nou isoformes d'AC transmembrana s'han identificat en mamífers, i una desena forma soluble (sAC), que no respon a proteïna G. Les ACs lligades a membrana es solen classificar en quatre categories diferents segons les seves propietats reguladores. El Grup 1 consisteix en les ACs estimulades per Ca<sup>+2</sup> (AC1, 3 i 8); el Grup 2 (AC2, 4 i 7) són estimulades per G $\beta\gamma$ ; el Grup 3 el conformen les ACs inhibides per Ca<sup>+2</sup> i Gi $\alpha$  (AC5 i 6); i el Grup 4 conté la isoforma AC9, insensible a l'agonista forskolina (**Taules 1 i 2**).

Mentre existeix una significant homologia de seqüència entre els membres dels grups 2 i 3, els membres del grup 1 són seqüencialment més distants (Kamenetsky et al. 2006). Això es veu reflectit en els patrons de regulació dels diversos grups.



## Introducció

**Taules 1 i 2.** Taula resum dels diferents mecanismes de regulació i l'expressió tissular per a les 9 isoformes d'Adenilat Ciclases.

AC	Localització cromosòmica	Regulació						
		Proteïnes G reguladores		Proteïnes cinases		Calci	RGS2	Altres
		estimulen	inhibeixen	estimulen	inhibeixen			
AC1	7p2	Gs $\alpha$	G $\alpha$ , i, z, o, G $\beta\gamma$	PKC $\alpha$	CaMK IV	↑ CaM		PAM
AC8	8q24	Gs $\alpha$	G $\beta\gamma$			↑ CaM		PP2A
AC3	2p22-24	Gs $\alpha$	G $\beta\gamma$	PKC $\alpha$	CaMKII	↑ CaM	↓	
AC2	5p15	Gs $\alpha$ , G $\beta\gamma$		PKC $\alpha$				
AC4	14q11.2	Gs $\alpha$ , G $\beta\gamma$			PKC $\alpha$			
AC7	16q12-13	Gs $\alpha$ , G $\beta\gamma$		PKC $\alpha$				PAM
AC5	3q13.2-q21	Gs $\alpha$ , G $\beta\gamma$	G $\alpha$ , i, z	PKC ( $\alpha$ , $\zeta$ )	PKA	↓ Ca <sup>+2</sup> lliure	↓	PAM, Ric8a
AC6	12q12-13	Gs $\alpha$ , G $\beta\gamma$	G $\alpha$ , i, z		PKA, PKC ( $\delta$ , $\epsilon$ )	↓ Ca <sup>+2</sup> lliure	↓	PAM, Snapin
AC9	16p13.3	Gs $\alpha$			PKC	↓ via calcineurina		

AC	Expressió tissular
AC1	Cervell i glàndula adrenal
AC2	Cervell, pulmó, múscul esquelètic i cor
AC3	Epiteli olfactiu, pàncrees, cervell, cor, pulmó i testicles
AC4	Ubiqua
AC5	Cor, nucli estriat, ronyó, fetge, pulmó, testicles i glàndula adrenal
AC6	Cor, ronyó, fetge, pulmó, cervell, testicles, múscul esquelètic i glàndula adrenal
AC7	Ubiqua
AC8	Cervell, pulmó, pàncrees, testicles i glàndula adrenal
AC9	Ubiqua
sAC	Testicles (però ha estat detectada en tots els teixits)

## 2.1. MECANISMES DE REGULACIÓ DE LES ADENILAT CILCLASES

### 2.1.1. REGULACIÓ PER PROTEÏNES G HETEROTRIMÈRIQUES

Totes les isoformes d'ACs transmembrana s'estimulen per la subunitat  $\alpha$  de la proteïna unida a GTP Gs ( $G_{\alpha}$ ). Existeix una variant, la  $G_{\alpha o}$ , que és altament homòloga a la  $G_{\alpha}$  i també estimula les ACs (Jones and Reed 1989). La proteïna  $G_{\alpha o}$  es troba expressada principalment al sistema olfatiu, però també es troba a altres teixits, com el nucli estriat. En les neurones olfatives i de l'estriat és la subunitat  $G_{\alpha o}$  la que predomina per sobre de la  $G_{\alpha}$  (Herve et al. 1993). Aquestes proteïnes G s'uneixen al domini C2 de les ACs.

Les diverses ACs presenten diferents afinitats per la subunitat  $G_{\alpha}$ , fet que podria explicar les diverses respostes a hormones i neurotransmissors que incrementen els nivells d'AMPc en diferents tipus cel·lulars.

Mentre que totes les formes d'AC són activades per  $G_{\alpha}$ , la inhibició a través de la subunitat  $G_{\alpha i}$  sembla ser específica d'isoforma. Aquesta subunitat de la proteïna  $G_i$  actua com un inhibidor no competitiu per AC5 i AC6 (Chen-Goodspeed et al. 2005). La proteïna  $G_{\alpha i}$  s'uneix al domini C1, i totes les altres ACs en són insensibles.

### 2.1.2. REGULACIÓ PER $Ca^{+2}$ i CALMODULINA

El  $Ca^{+2}$  unit a la calmodulina és un important regulador de les ACs del grup 1. La  $Ca^{+2}$ /calmodulina activa AC1 i AC8 mitjançant la unió directa en el lloc d'unió a calmodulina situat a la regió C1 de l'AC1 o al domini C2 de l'AC8 (Cali et al. 1994). La calmodulina trencaria una interacció autoinhibitòria que es produeix entre els dominis C1 i C2 i la regió catalítica. L'activitat d'AC3 també ve estimulada de forma condicional per la calmodulina, però requereix la presència de  $G_{\alpha}$  o forskolina (Choi et al. 1992).

Un altre tipus de regulació pot ser la inhibició dependent de calmodulina mitjançant les calmodulina quinases (CaMK). Per exemple, CaMKII fosforil·la directament AC3 i inhibeix la seva activitat, i això serveix com un important mecanisme de retroalimentació en el sistema olfatiu (Wei et al. 1996); AC1 pot ser fosforil·lada per la CaMKIV, i aquesta modificació inhibeix l'activitat estimulada per calmodulina (Wayman et al. 1996).

Totes les isoformes d'AC són inhibides per concentracions elevades i no fisiològiques de  $Ca^{+2}$ , mitjançant la competició pel  $Mg^{+2}$  al centre actiu. No obstant, AC5 i AC6 poden ser inhibides per  $Ca^{+2}$  a concentracions submicromolars (Guillou et al. 1999), fet que pot tenir

una gran importància fisiològica en la generació de senyals oscil·lants de  $\text{Ca}^{+2}$  i AMPc (Cooper and Brooker 1993).

### 2.1.3. REGULACIÓ PER PROTEÍNES CINASES

La majoria de les ACs vénen regulades per la PKA o la PKC. Per exemple, la PKA serveix com a inhibidor retroactiu per les isoformes AC5 i AC6 (Iwami et al. 1995). La regulació per PKC pot ser tant inhibidora com estimuladora. Normalment l'estimulació per PKCs convencionals (PKC $\alpha$  i PKC $\delta$ ) es produeix de forma sinèrgica amb altres formes de regulació. En el cas d'una PKC atípica, com la PKC $\zeta$ , l'estimulació de les ACs pot produir efectes temporals, prolongant la producció d'AMPc en presència d'inositol trifosfat (IP $_3$ ), el missatger secundari que activa aquesta quinasa (Dessauer and Nguyen 2005). També es pot produir una inhibició per PKC, convencionals o atípiques: PKC $\alpha$  inhibeix l'AC4 estimulada per G $\alpha$  (Zimmermann and Taussig 1996); i PKC $\zeta$  i PKC $\epsilon$  inhibeixen l'activitat d'AC6 (Lai et al. 1997). Els llocs de fosforilació per PKC són força diferents entre les diverses isoformes.

S'ha demostrat que altres quinases també exerceixen un efecte regulador sobre les ACs, i algunes fosfatases també podrien regular la seva activitat.

### 2.1.4. ACTIVACIÓ PER FORSKOLINA

La forskolina és un diterpè derivat de l'arrel de la planta *Coleus forskholii*. Produeix una forta activació de totes les isoformes d'ACs lligades a membrana menys de l'AC9 (Hacker et al. 1998). Una única molècula de forskolina s'uneix entre els dominis C1 i C2, en el lloc estructuralment relacionat amb el centre actiu de l'AC (Dessauer et al. 1997). L'AC9 ha perdut un residu clau relacionat amb el lloc d'unió a forskolina i per això n'és insensible. AC2, 4, 5, 6 i 7 són activades de forma sinèrgica per Gs i forskolina, mentre que en AC1, 3 i 8 l'efecte és additiu.

## 2.2. ADENILAT CICLASES I FUNCIO CEREBRAL

### 2.2.1. PLASTICITAT SINÀPTICA I MEMÒRIA

Tot i que la majoria d'ACs es troben expressades a nivell cerebral, la seva expressió es troba restringida a certes estructures del SNC (Sanabra and Mengod 2011). Les ACs activades per  $\text{Ca}^{+2}$ /calmodulina (AC1 i AC8) són les que tenen un paper clau en la funció cerebral, especialment en la plasticitat sinàptica, la potenciació a llarg termini (LTP) i la memòria.

L'AC1 està expressada majoritàriament a l'hipocamp, el neocòrtex, el còrtex entorrinal, el cerebel, el bulb olfactiu i la glàndula pineal (Xia et al. 1991). Per poder estudiar la funció d'aquesta isoforma, ratolins *knockout* per AC1 (AC1<sup>-/-</sup>) foren generats per Wu i col·laboradors (1995). Els ratolins AC1<sup>-/-</sup> presentaven una activitat estimulada per Ca<sup>+2</sup> disminuïda al cerebel, el còrtex i la formació hipocampal. La disminució dels nivells d'AMPC estimulats per Ca<sup>+2</sup> correlacionava amb una disminució de LTP al les regions CA1/CA3 de l'hipocamp i al cerebel, i amb un dèficit en la memòria espacial (Storm et al. 1998). Els dèficits observats a l'hipocamp es produïen a les primeres fases de l'LTP, suggerint una contribució en la plasticitat enzimàtica d'aquesta activitat ciclasa. La sobreexpressió d'AC1 produeix una millora en la memòria de reconeixement i l'LTP degut a una millora en la senyalització ERK/MAPK (Wang et al. 2004).

L'AC8 també es troba expressada en múltiples regions cerebrals, com l'hipocamp, el bulb olfactiu, el tàlam, l'habènula, el còrtex cerebral i els nuclis supraòptic i paraventricular de l'hipotàlam (Cali et al. 1994). Els ratolins AC8<sup>-/-</sup> mostren una activitat AC estimulada per Ca<sup>+2</sup> disminuïda a l'hipocamp, l'hipotàlam, el tàlam i el tronc de l'encèfal, i no presenten LTP de fibres *mossy* (Schaefer et al. 2000). La plasticitat a curt termini també es veu afectada en aquests ratolins.

Encara que tinguin funcions comuns, també existeixen diferències en les vies que controlen AC1 i AC8. Per exemple, l'AC1 és necessària per la plasticitat homeostàtica durant activitats de deprivació (Gong et al. 2007), mentre que l'AC8 està més implicada en la plasticitat sinàptica relacionada amb l'ansietat (Schaefer et al. 2000).

### 2.2.2. PLASTICITAT SINÀPTICA RELACIONADA AMB EL DOLOR

S'ha pogut establir un paper clau de l'AMPC en la sensibilització dels nociceptors i en la projecció de neurones nociceptives de la medul·la espinal després d'estímuls nocius i inflamació (revisat a (Hucho and Levine 2007)).

L'AC1 té un paper important en el dolor muscular agut i crònic, tot i que altres ACs presents poden restablir la seva funció. L'AC5 també té un fort efecte en les respostes agudes i cròniques al dolor; de fet els ratolins AC5<sup>-/-</sup> presenten una resposta al dolor atenuada (Kim et al. 2007).

Els estudis farmacològics confirmen la medul·la espinal com el principal lloc d'acció per la resposta el dolor, i tant AC1 com AC5 les trobem expressada a nivell de la medul·la espinal (Ehnert et al. 2004).

### 2.2.3.EXCITOTOXICITAT I NEURODEGENERACIÓ

L'AC1 estimulada per  $Ca^{+2}$  modula les respostes neuronals a excitotoxicitat i podria servir com a nova diana terapèutica pel tractament de l'excitotoxicitat neuronal en l'ictus i les malalties neurodegeneratives, ja que els ratolins AC1<sup>-/-</sup> presenten una mort neuronal disminuïda per excitotoxicitat provocada per glutamat (Wang et al. 2007).

### 2.2.4.FUNCIONS MOTORES

L'estriat és la regió cerebral més important per la planificació i la programació dels moviments voluntaris, i aquestes funcions impliquen la senyalització a través dels receptors de dopamina. L'AC5 la trobem altament expressada a l'estriat, i els animals AC5<sup>-/-</sup> mostren una reducció de l'activitat induïda per forskolina a l'estriat, però també al còrtex cerebral i el cerebel. Només un 10% de l'activitat AC estimulada pel receptor de dopamina D1 i un 17% de l'activitat estimulada pel receptor d'adenosina A2A resten a l'estriat d'aquests ratolins, mentre que l'activitat inhibidora d'AC del receptor de dopamina D2 és totalment absent (Lee et al. 2002). L'AC5 és la isoforma acoblada al receptor D2 i té un paper molt important en els efectes secundaris motors de les drogues antipsicòtiques. A més, l'AC5 és l'enzim de convergència entre les senyals dopaminèrgiques D1 i D2, i la inhibició d'AC5 a través de la proteïna Giα és crucial pel control motor dependent d'AMPC.

### 2.2.5.DROGODEPENDÈNCIA

#### 2.2.5.1.Morfina

L'analgèsia induïda per opiacis és deguda a l'activació de la proteïna Gi acoblada al receptor opioide  $\mu$ , i també, però no tant, al receptor opioide  $\delta$ . Les seves propietats analgèsiques estan relacionades a la inhibició de l'AC, la inhibició dels canals de  $Ca^{+2}$  dependents de voltatge, i a l'activació dels canals de  $K^{+}$  per la proteïna Gi (Nestler and Aghajanian 1997). L'ús a llarg termini de morfina produeix una regulació a l'alça dels components de la transducció de senyal de l'AC (AC, PKA o CREB) en regions del cervell associades al reforç i la retirada en drogues. L'AC1 i l'AC8 es troben regulades a l'alça en exposicions a llarg termini de morfina.

L'AC5 també s'ha vist implicada com a mediador de l'acció de la morfina a l'estriat (Kim et al. 2006). Els nivells més alts de receptors opioides  $\mu$  els trobem a l'estriat, implicats en mecanismes de recompensa (Mansour et al. 1994), i d'aquí els efectes comportamentals de la morfina.

La senyalització per AMPc és, doncs, important en la dependència a opioides: AC1 i AC8 tenen papers importants en la retirada, l'hiperlocomoció, i les respostes d'aprenentatge; mentre que l'AC5 es troba involucrada en els efectes en el comportament de la morfina, incloent analgèsia, locomoció, recompensa, tolerància i retirada.

#### 2.2.5.2. Etanol

Un augment en els nivells d'AMPc (degut a la sobreexpressió d'AC7) resulta en nivells elevats de DARPP32 fosforil·lada, una fosfoproteïna regulada per dopamina i AMPc, i que ha estat relacionada amb els efectes motivacionals de l'alcohol (Donohue et al. 2005). L'activitat AC7 en plaquetes s'ha proposat com un marcador per l'alcoholisme (Tabakoff et al. 1988).

### 2.3. ADENILAT CICLASES I SISTEMA OLFACIU

Els odorants interaccionen amb els receptors acoblats a proteïna G per estimular l'AC a través de la Golf. L'AMPc s'uneix directament als canals iònics dependents de nucleòtids cíclics (CNG) produint una entrada de cations (principalment  $Ca^{+2}$ , però també  $Na^{+}$ ) i una petita despolarització de les neurones olfactives. L'entrada de  $Ca^{+2}$  obre els canals de  $Cl^{-}$  dependents de  $Ca^{+2}$ , per polaritzar encara més la neurona, generant un potencial d'acció.

L'AC3, així com la proteïna Golf i els canals CNG, els trobem expressats a l'epiteli olfactiv, i la supressió gènica d'AC3 confirma el seu paper clau en l'olfacte (Wong et al. 2000).

### 2.4. ADENILAT CICLASES I FUNCIO CARDIACA

L'estimulació simpàtica al cor porta a un increment de l'activitat AC, que resulta en una activació de la PKA i la fosforilació d'un gran nombre de proteïnes efectores. Aquests substrats de la PKA es troben implicats en la contractilitat cardíaca, la captació de  $Ca^{+2}$  i la relaxació cardíaca. L'AC5 i l'AC6 són les isoformes majoritàries als miòcits cardíacs.

L'eliminació del gen de l'AC5 porta a una disminució de l'activitat basal i estimulada a les membranes cardíques i als miòcits aïllats (Okumura et al. 2003).

Però el major efecte de la supressió d'AC5 el trobem a la regulació de l'AMPc al sistema parasimpàtic. Aquesta eliminació resulta en una pèrdua completa de la inhibició per Gi mitjançant l'acetilcolina i en una significant reducció de la inhibició de la producció d'AMPc deguda al  $Ca^{+2}$  (Okumura et al. 2003). Aquests efectes en la regulació de la funció cardíaca parasimpàtica podrien explicar en part l'increment de la freqüència cardíaca

basal observat en els ratolins AC5<sup>-/-</sup>. Aquests animals tenen més esperança de vida i estan protegits en front miopaties cardíques degudes a l'edat (Yan et al. 2007).

La supressió d'AC6 resulta en un fenotip diferent. Tant AC5 com AC6 s'expressen igual al néixer, però AC5 és la isoforma dominant en el cor adult. L'eliminació d'AC6 no produeix canvis en els nivells d'AMPc en condicions basals (Tang et al. 2008), però s'han observat nivells disminuïts d'AMPc en miòcits estimulats.

Ambdues isoformes són altament regulades amb un gran nombre d'inputs inhibitoris per tal de controlar curosament els nivells d'AMPc. Clarament, el cor té moltes maneres de controlar de forma precisa la producció i la utilitat d'aquest missatger secundari.

### **2.5. ADENILAT CICLASES I DIFERENCIACIÓ CEL·LULAR**

En la majoria de tipus cel·lulars, la concentració intracel·lular d'AMPc afecta a la progressió del cicle cel·lular. L'augment dels nivells d'AMPc intracel·lulars normalment suprimeix els senyals mitòtics a través de la fosforilació de Raf per PKA (Chen and Iyengar 1994). La identitat molecular de cada isoforma expressada en una cèl·lula i l'habilitat d'aquesta isoforma per integrar els senyals provinents dels receptors de factors de creixement són determinants en la proliferació cel·lular. La importància de l'AMPc en la diferenciació cel·lular s'ha pogut demostrar in diferents tipus cel·lulars on la diferenciació ve acompanyada per l'expressió d'ACs específiques.

### **2.6. ADENILAT CICLASES I FUNCIÓ ESPERMÀTICA**

Els nivells intracel·lulars d'AMPc a l'esperma regulen la mobilitat dels espermatozous i la seva capacitat per fertilitzar l'òvul (Leclerc et al. 1996). Aquesta capacitat de l'esperma s'inicia per un increment de les concentracions de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, que activen directament l'única AC de mamífers que no està unida a membrana, la sAC. (Demarco et al. 2003). Aquest increment dels nivells d'AMPc és necessari per induir la capacitat de l'esperma a través de diverses vies de senyalització (Carrera et al. 1996). Els ratolins deficientes per sAC no mostren canvis en la histologia o el comportament, únicament són infèrtils i els seus espermatozous no es mouen (Esposito et al. 2004).

### **2.7. ADENILAT CICLASES COM A DIANA FARMACOLÒGICA**

Les diverses isoformes d'ACs s'estan estudiant com a dianes terapèutiques potencials, degut a la seva implicació en nombrosos processos fisiològics. Alguns compostos ja es troben en ús clínic (com el compost NKH447, aprovat al Japó pel tractament de l'atac de

cor avançat), i d'altres estan encara en fases preclíniques. És important trobar inhibidors o activadors selectius per cada isoforma, ja que cadascuna té un paper diferent en la regulació dels nivells d'AMPc en diversos teixits. Però aquest objectiu ha esdevingut un gran repte pels investigadors, ja que les nou isoformes d'ACs unides a membrana comparteixen una estructura molt similar i són altament homòlogues en els seus centres actius. Això ha fet que s'hagin centrat esforços en regular les concentracions i les propietats farmacocinètiques dels compostos no selectius per tal de poder utilitzar-los amb finalitats terapèutiques i esperant els mínims efectes adversos (revisat a (Pierre et al. 2009)).



### 3.FOSFODIESTERASES

Les fosfodiesterases de nucleòtids cíclics (PDEs) són una família de fosfohidrolases relacionades entre si que catalitzen de forma selectiva la hidròlisis dels enllaços 3' fosfat cíclic d'adenosina (AMPc) i/o guanosina (GMPc) 3',5' monofosfat cíclic.

Poc després del descobriment de l'AMPc per Sutherland i col·laboradors, es va descriure l'activitat PDE de nucleòtids cíclics (Butcher and Sutherland 1962). Amb el descobriment del GMPc, es va comprovar que tant AMPc com GMPc podien ser hidrolitzats pel mateix tipus d'activitat. Posteriorment, amb els assajos realitzats utilitzant substrats radioactius, es va arribar a la conclusió que havien d'existir formes múltiples de PDEs amb propietats cinètiques i reguladores diferents (Thompson et al. 1979; Beavo et al. 1982). No obstant, fins que no van arribar les tècniques de fraccionament d'alta resolució, els anticossos monoclonals, i les tècniques de seqüenciació i clonatge molecular, no es va poder demostrar el gran nombre de productes gènics diferents de les PDEs.

Cada únic tipus cel·lular pot expressar diverses PDEs. De fet, la naturalesa i localització d'aquestes PDEs funcionaran com a regulador de la concentració local d'AMPc o GMPc dins la cèl·lula. Les PDEs es regulen no tan sols a nivell genètic, sinó també per diversos mecanismes bioquímics com fosforilació/desfosforilació, unió al·lostèrica d'AMPc o GMPc, unió de  $Ca^{+2}$ /calmodulina, i diferents interaccions proteïna-proteïna.

De forma generalitzada, aquestes proteïnes poden actuar com efectors en la transducció de senyals per la seva interacció amb GPCRs (Stryer 1996); com a reguladors homeostàtics controlant els nivells d'AMPc i GMPc; com factors clau en vies cel·lulars dependents de nucleòtids cíclics (Conti et al. 1995); o com a responsables de la seva compartimentalització cel·lular (Houslay 1995; Baillie and Houslay 2005).

#### 3.1. CLASSIFICACIÓ I NOMENCLATURA DE LES PDES

La superfamília de les PDEs la conformen 11 famílies diferents producte de 21 gens. No obstant, existeixen més de 21 ARNm i proteïnes que es transcriuen d'aquests gens degut als inicis de transcripció alternatius i a l'*splicing* alternatiu de les molècules precursors de l'ARNm. Es calcula que es produeixen més de 100 ARNm diferents, i que la majoria es tradueixen a proteïnes.

Les famílies de PDE es classifiquen segons la seqüència d'aminoàcids que les conformen, les seves propietats bioquímiques, la sensibilitat que presenten a inhibidors, els mecanismes reguladors i les seves afinitats per AMPc o GMPc (**Taula 3**).

Existeix una rellevància fisiològica de l'existència de múltiples isoformes de PDEs en l'organisme. Encara que existeixi certa redundància entre els diversos enzims, la majoria, sinó totes, les diferents variants de PDEs tenen papers fisiològics específics.

**Taula 3.** Principals característiques de les famílies de fosfodiesterases (Bender and Beavo 2006).

PDE	Gen	Localització cromosòmica	Substrat	$K_m$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	Regulació	Expressió tissular
PDE1	PDE1A	2q32.1	cAMP	73-120	Ca <sup>2+</sup> /calmodulina	Cervell, múscul llis, cor, testicles
			cGMP	2.6-5		
	PDE1B	12q13	cAMP	10-24		
PDE1C	7p15.1-p14.3		cGMP	1.2-5.9		
			cAMP	0.3-1.2		
PDE2	PDE2A	11q13.4	cGMP	0.6-2.2	Estimulació cGMP	Còrtex adrenal, cervell, cor
			cAMP	30-50		
PDE3	PDE3A	12p12	cGMP	10-30	Inhibició cGMP	Cor, múscul llis, teixit adipós, plaquetes
			cAMP	0.02-0.15		
PDE3B	11p15.1		cAMP	0.18		
			cGMP			
PDE4	PDE4A	19p13.2	cAMP	2.9-10	Específica cAMP	Ubiqua
	PDE4B	1p31				
	PDE4C	19p13.11				
	PDE4D	5q12				
PDE5	PDE5A	4q25-q27	cGMP	1-6.2	Uneix cGMP, específica cGMP	Múscul llis, plaquetes, cerebel
PDE6	PDE6A	5q31.2-q34	cGMP	15-17	Fotoreceptors	Retina
	PDE6B	4p16.3				
	PDE6C	10q24				
PDE7	PDE7A	8q13	cAMP	0.1-0.2	Rolipram insensitiva	Múscul esquelètic, sistema immune, cervell
	PDE7B	6q23-q24				
PDE8	PDE8A	15q25.3	cAMP	0.04-0.06	Específica cAMP	Sistema immune, fetge, ronyó, testicles, tiroides
	PDE8B	5q14.1				
PDE9	PDE9A	21q22.3	cGMP	0.17-0.39	Específica cGMP	Cervell, ronyó
PDE10	PDE10A	6q26	cAMP	0.26	Inhibició cAMP, substrat dual	Cervell, testicles
			cGMP	7.2		
PDE11	PDE11A	2q31.2	cAMP	1.04-5.7	Substrat dual	Pròstata, testicles, múscul esquelètic
			cGMP	0.52-4.2		

El fet que existeixin diferents ARNm i seqüències proteiques, així com llocs d'inici de transcripció alternatius regulats per diferents regions promotores, té una importància funcional.

El gran nombre de PDEs presents en mamífers ha promogut certa polèmica en qüestions de nomenclatura. Això es va intentar solucionar fa uns anys, quan un grup d'experts en el tema van arribar a un sistema consens que des de llavors segueixen la majoria d'autors (Beavo et al. 1994). La nomenclatura d'una de les variants quedaria de la següent manera: **mPDE4B2**, on **m** designa l'espècie (*mice* o ratolí en aquest cas); **PDE4** la família; **B** el gen dins la família; i **2** la variant d'*splicing*.

### 3.2. ESTRUCTURA MOLECULAR DE LES PDES

Totes les PDEs comparteixen una estructura molt similar que pot dividir-se en tres dominis diferents: un domini a l'extrem amino (NH<sub>2</sub>), una regió conservada que conforma el domini catalític, i un tercer domini a l'extrem carboxil (COOH).

Els plegaments i elements estructurals de cada domini catalític són força similars tot i que la seqüència per a cadascun d'ells només presenti una homologia al voltant del 30% entre les diferents famílies, però fins a un 65% entre membres de la mateixa família. Aquests dominis catalítics contenen tres subdominis formats bàsicament per 16 hèlixs. El centre actiu el conforma la unió d'aquestes hèlixs per residus altament conservats entre totes les PDEs. A la zona d'unió a substrat ho trobem dos llocs d'unió a cations divalents (Zn<sup>+2</sup> i Mg<sup>+2</sup>). El lloc d'unió a Zn<sup>+2</sup> té dos residus d'histidina i dos d'àcid aspàrtic absolutament conservats entre totes les PDEs. Aquests residus formen part de la seqüència de reconeixement de les PDEs de nucleòtids cíclics, que a la vegada forma part d'un domini estructural que comparteixen les superfamílies d'enzims amb activitat fosfohidrolasa.

Els estudis estructurals han proposat un mecanisme molecular per explicar l'especificitat per nucleòtids cíclics de les PDEs, el que s'anomena *intercanviador de glutamina*. Sembla que existeix un residu de glutamina conservat que estabilitza la unió de l'anell de purina. Per tal de poder formar els ponts d'hidrogen en la hidròlisis tant d'AMPc com de GMPc, aquesta glutamina ha de ser capaç de rotar lliurement. Per les PDEs que hidrolitzen de forma selectiva AMPc a baixes concentracions, aquesta glutamina queda restringida de moviment per residus aminoacídics veïns que afavoreixen la orientació per la unió d'AMPc. El mateix passa amb el GMPc, però amb una altra orientació de la glutamina afavorint la seva unió.

L'extrem N-terminal de la majoria de PDEs presenta funcions reguladores que tenen impacte en el domini catalític de l'enzim. Aquests dominis són essencials per la unió a lligand, l'oligomerització i el reconeixement/fosforilació de quinases. Aquests dominis

també són capaços de controlar la conformació del domini catalític i presenten una marcada homologia entre les diverses PDEs que els presenten. També s'han descrit dominis reguladors a l'extrem C-terminal, bàsicament llocs de fosforilació per quinases.

### 3.3. PDEs COM A DIANA FARMACOLÒGICA

Els inhibidors de PDE s'uneixen a lloc actiu i es poden unir de tres formes diferents: a través de ponts d'hidrogen amb residus implicats en la unió a nucleòtids, a través de la interacció amb residus hidrofòbics que conformen el lloc d'unió o a través de la interacció amb els cations divalents mitjançant molècules d'aigua (Card et al. 2004; Jeon et al. 2005).

Una de les raons per les quals s'ha considerat les PDEs com a dianes terapèutiques és el principi farmacològic bàsic que regular la degradació de qualsevol lligand o missatger secundari porta sovint a un canvi més ràpid i més gran en la seva concentració en comparació amb la regulació de la seva síntesis.

Una altra raó per la qual són bones dianes farmacològiques es relaciona amb les concentracions dels seus substrats a les cèl·lules. Els nivells d'AMPc i GMPc en la majoria de cèl·lules són  $<1$  a  $10 \mu\text{M}$ . Això significa que un inhibidor competitiu no necessita competir amb nivells molt elevats de substrat endogen per ser efectiu. En el cas de les quinases, que utilitzen ATP com a substrat, molt abundant a nivell cel·lular, dificulta la creació d'inhibidors. Al mateix temps, un inhibidor com aquest ha de ser selectiu entre els altres milers d'enzims que utilitzen ATP. Però el fet que les PDEs són relativament úniques en els requeriments de reconeixement de substrat i que utilitzen un substrat que és de 100 a 1000 vegades més baix que l'ATP, fa que siguin una diana farmacològica molt més atractiva que d'altres enzims.

Els primers inhibidors de PDE tenien un índex terapèutic molt estret, ja que inhibien a la majoria o pràcticament tota l'activitat PDE en tots els teixits. Entre ells destaquen les metilxantines (cafeïna, teofilina, IBMX o papaverina), inhibidors no selectius amb molts efectes secundaris. Més endavant es va desenvolupar una segona generació d'inhibidors, amb major afinitat i selectivitat per cadascuna de les famílies de PDEs. Dins d'aquest grup podem destacar els inhibidors de PDE5 (sildenafil o *Viagra*, vardenafil i tadalafil) o els inhibidors de PDE4, àmpliament utilitzats en el tractament de diferents patologies com les malalties respiratòries (cilomilast i roflumilast) o la depressió (rolipram).

Se sap que s'expressen un gran nombre de PDEs en els teixits dels mamífers, i que cadascuna d'aquestes PDEs té una estructura diferent en el lloc actiu. A més, el fet que existeixen diverses isoformes va lligat amb les distintes funcions fisiològiques que exerceix cadascuna en l'organisme i, per inferència, a condicions patològiques varies. Per tant, seria possible i d'un gran interès poder desenvolupar inhibidors selectius d'isoforma per tal de modificar o modular funcions específiques i condicions patològiques sense tenir efectes secundaris no desitjats degut a la inespecificitat del compost (Bender and Beavo 2006).

A continuació passarem a resumir les principals característiques de cadascuna de les 11 famílies de PDEs i les seves isoformes, fent principal èmfasis en la PDE4, essent part central d'aquest treball.

### 3.4. SUPERFAMÍLIA DE LES PDEs

#### 3.4.1. FAMÍLIA PDE1

Les PDE1s, fosfodiesterases  $Ca^{+2}$ /calmodulina dependents, van ser una de les primeres famílies en ser identificades (Cheung 1970). La unió d'un complex  $Ca^{+2}$ /calmodulina (CaM) per monòmer en els llocs d'unió propers a l'extrem N-terminal estimularà la hidròlisis del nucleòtid cíclic. Les tres isoformes de PDE1 que es coneixen, PDE1A, PDE1B, i PDE1C, es troben expressades en diferents tipus cel·lulars i regions intracel·lulars i, d'aquesta manera, poden ajudar a regular de forma diferencial una sèrie de processos fisiològics dependents de nucleòtids cíclics d'una forma calci-dependent (Goraya and Cooper 2005).

Tots els enzims de la família PDE1 poden hidrolitzar tant AMPc com GMPc, però l'afinitat per cada nucleòtid varia segons la isoforma. Les PDE1As són altament específiques per GMPc; no obstant, a nivells elevats d'ambdós substrats, les taxes d'hidròlisis són més similars. Els enzims PDE1B també prefereixen GMPc com a substrat, mentre que les PDE1Cs hidrolitzen els dos nucleòtids per igual.

Les tres isoformes de PDE1 són productes de tres gens diferents, i les tres tenen variants úniques producte de l'*splicing* alternatiu o de llocs d'inici de transcripció alternatius. Les diferències que s'observen entre elles són bàsicament en l'afinitat per CaM, ja que les seqüències N-terminal en les que difereixen es troben en els dominis d'unió a CaM o bé molt a prop.

Totes les isoformes de PDE1 es troben expressades en el cervell i en moltes neurones perifèriques, però en diferents quantitats depenent de la regió (Yan et al. 1995). L'expressió de PDE1 es troba localitzada de forma diferent no només segons la regió, sinó també entre les neurones del mateix tipus dins d'una única regió. Algunes PDE1 també les trobem expressades en els testicles i l'esperma en el sistema reproductiu (Yan et al. 2001), en el cor i els vasos sanguinis, i en macròfags i cèl·lules T en el sistema immune (Essayan 2001). La majoria d'isoformes es creu que són citosòliques.

S'han descrit diverses funcions de les PDE1s. Les PDE1As participen probablement en la contracció de la musculatura llisa vascular (Nagel et al. 2006) i podrien tenir un paper en la funció espermàtica. La PDE1B es troba implicada en la senyalització dopaminèrgica (Reed et al. 2002) així com en l'activació i supervivència de les cèl·lules del sistema immune (Bender et al. 2005). La PDE1C és necessària per la proliferació de les cèl·lules de la musculatura llisa vascular (Vandeput et al. 2007) i podria regular també la funció espermàtica i la senyalització neuronal.

#### 3.4.2.FAMÍLIA PDE2

La PDE2 és un enzim de substrat dual que presenta la mateixa taxa d'hidròlisis per AMPc i GMPc. La seva característica principal és que ve estimulada de forma al·lostèrica per la unió de GMPc a un dels seus dominis GAF. Només se n'ha descrit una isoforma, la PDE2A. PDE2 s'expressa en un gran nombre de tipus cel·lulars, té una regulació bioquímica força complexa, i té la capacitat d'hidrolitzar tant AMPc com GMPc amb activitat elevada, per tant és lògic pensar que estarà involucrada en regular una gran varietat de processos diferents i les seves funcions no poden ser generalitzades.

Les proteïnes PDE2 es troben expressades en cor, fetge, glàndula adrenal i plaquetes (Martins et al. 1982; Yamamoto et al. 1983); i també s'han identificat en cervell, cèl·lules endotelials i macròfags (Bender et al. 2004). Com en el cas de la resta de PDEs, la seva expressió és regulada, i un cop generada, es pot trobar en regions concretes o tipus cel·lulars específics dins d'un mateix teixit.

Degut a la seva característica d'enzim de substrat dual, s'ha observat que sovint la PDE2 intervé en la comunicació en les vies d'AMPc i GMPc; regula la secreció d'aldosterona a la glàndula adrenal (Cote et al. 1999), l'AMPc i la fosforilació per PKA dels canals de  $Ca^{+2}$  al cor (Verde et al. 1999), els nivells de GMPc a les neurones, la memòria a llarg termini (Boess et al. 2004), i la funció de barrera de les cèl·lules endotelials sota condicions inflammatòries (Seybold et al. 2005).

### 3.4.3.FAMÍLIA PDE3

La característica principal de la família de PDE3 és la seva propietat bioquímica d'hidrolitzar tant AMPc com GMPc, però amb la particularitat que la hidròlisis d'AMPc pot ser inhibida per GMPc. També es distingeix per l'habilitat de ser activada per diverses vies de fosforilació incloent la via de PKA i la via PI3K/PKB. *In vitro*, el GMPc pot actuar com un inhibidor de la hidròlisis d'AMPc. Aquesta inhibició també s'ha descrit en cèl·lules, com s'ha observat en plaquetes (Maurice and Haslam 1990), i es creu que passa el mateix a la resta de cèl·lules que contenen PDE3.

S'han identificat dues isoformes de PDE3, PDE3A i PDE3B. Ambdues presenten un alt grau d'homologia entre els seus aminoàcids, al voltant del 80%, i propietats cinètiques similars.

L'activitat de PDE3A i PDE3B ve regulada per fosforilació en resposta a estimulació hormonal en molts tipus cel·lulars (Shakur et al. 2001). Es creu que aquestes fosforilacions són importants per molts dels processos biològics controlats per hormones com la insulina o la leptina.

S'han descrit tres variants de la isoforma PDE3A (PDE3A1/2/3) (Wechsler et al. 2002). En el cas de la PDE3B, s'han detectat proteïnes de diferents mides, però no s'han identificat variants d'*splicing* o d'inici de transcripció alternatiu. Es pensa que aquestes proteïnes de mides diverses que s'han aïllat dels teixits són degudes a la proteòlisis.

La isoforma PDE3A la trobem expressada de forma abundant a les plaquetes, i també a la musculatura llisa vascular, als miòcits cardíacs i als oòcits. La PDE3B és una PDE majoritària del teixit adipós, el fetge i el pàncrees, així com de molts teixits del sistema cardiovascular (Shakur et al. 2001).

La PDE3A regula la contracció cardíaca (Hambleton et al. 2005), l'agregació plaquetària (Sun et al. 2007), la contracció de la musculatura llisa vascular, la maduració dels oòcits (Richard et al. 2001) i regula l'alliberació de renina (Friis et al. 2002). La PDE3B intervé en la senyalització per insulina, especialment en el seu efecte antilipolític (Degerman et al. 1998), regula la proliferació i el cicle cel·lular i intervé en l'efecte inhibitori de la leptina sobre la secreció d'insulina i l'alliberació de renina (Zhao et al. 2002).

### 3.4.4.FAMÍLIA PDE4

Aquesta és una família d'enzims amb activitat PDE específica per AMPc a nivells baixos de substrat. Aquesta activitat va ser caracteritzada en un principi pel fet que podia ser inhibida de forma selectiva pel compost rolipram. És una de les famílies de PDEs més



estudiada, i es coneix molt sobre les seves propietats bioquímiques, els gens i la seva funció fisiològica.

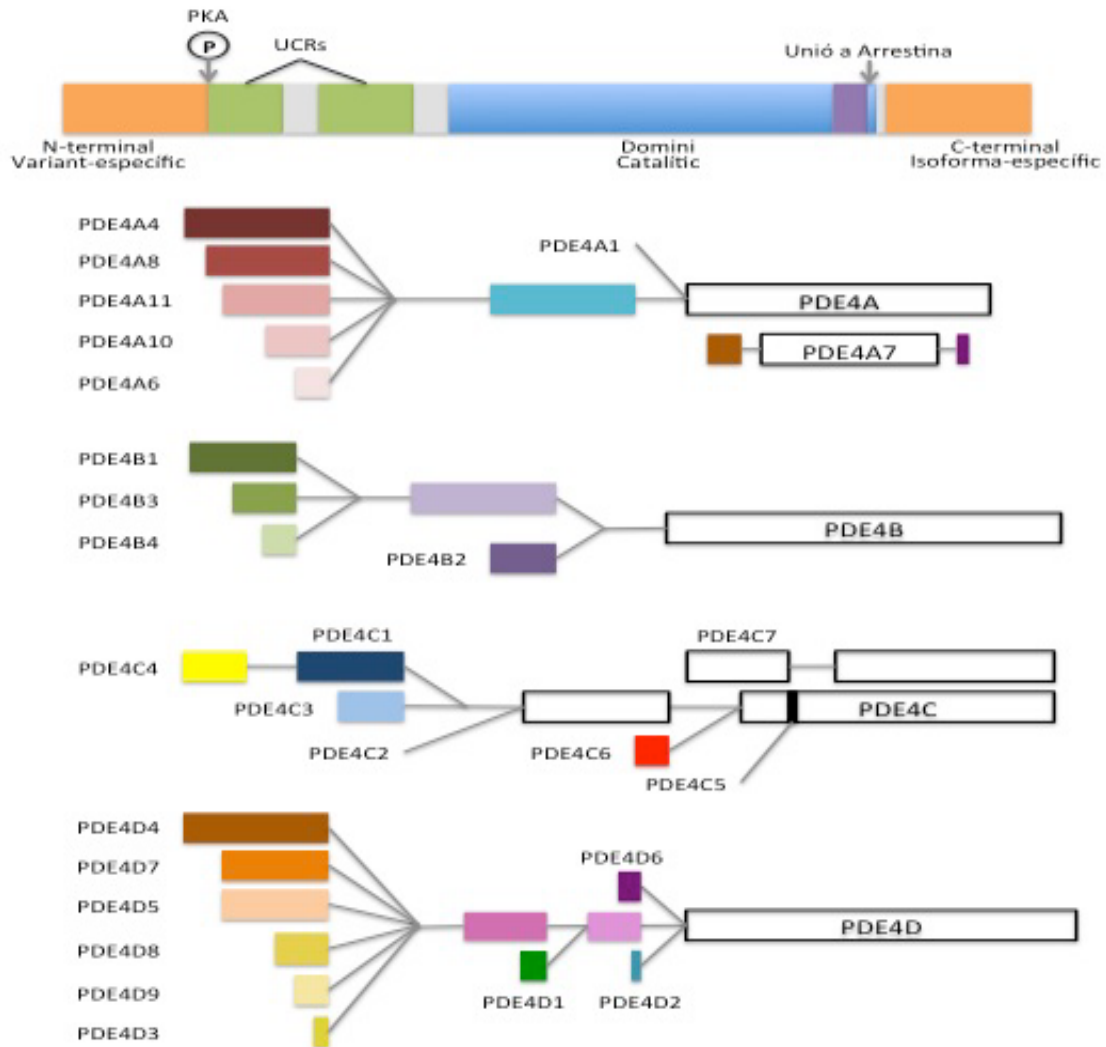
#### 3.4.4.1. Estructura de les PDE4

S'han descrit quatre gens (PDE4A-D), i cada gen conté múltiples variants. De fet, en l'actualitat n'hi ha descrites més d'una vintena, i cadascuna d'aquestes variants es caracteritza per una regió N-terminal única, que codifica per dominis reguladors i llocs de fosforilació. Per generar totes aquestes isoformes diferents s'han caracteritzat diversos promotors, tot i que un dels més comuns entre elles és el promotor CRE, al qual s'uneix la proteïna d'unió a CRE (CREB) i que es regula a través de l'AMPc.

Les isoformes funcionals de PDE4 es poden dividir (**Figura 3**) en tres categories principals: llargues, curtes i supercurtes (Bolger et al. 1993; Houslay 2001). Les isoformes llargues es caracteritzen per dos dominis conservats a les quatre subfamílies de PDE4, anomenats *upstream conserved regions* 1 i 2 (UCR1 i UCR2). A diferència de les formes llargues, les curtes no contenen l'UCR1, mentre que les formes supercurtes no només els falta l'UCR1, sinó que tenen un UCR2 truncat. Aquestes dues regions s'uneixen a través de la regió d'unió 1 (LR1), la composició de la qual es diferent entre les subfamílies de PDE4; l'UCR1 s'uneix a la regió catalítica a través de LR2, que també difereix entre les quatre variants de la família. La unitat catalítica, composta per uns 300 aminoàcids, consta de tres subdominis diferents. I també hi trobem una regió a l'extrem C-terminal, de la qual encara no se sap ben bé la seva funció, i que és única per cadascuna de les quatre subfamílies.

Els dominis UCR1 i UCR2, quan van ser descrits per primer cop, es van proposar com elements característics de les PDE4 (Bolger et al. 1993). Estudis més recents han pogut confirmar que UCR1 i UCR2 formen part de la maquinària molecular que confereix funcions reguladores clau a la unitat catalítica de les PDE4 (Beard et al. 2000). Això ajuda a explicar perquè l'*splicing* alternatiu de l'ARNm genera formes llargues, curtes o supercurtes que varien en UCR1/2 i per tant, tenen diferents propietats reguladores. El primer indici que UCR1/2 exercien un paper regulador es va observar al eliminar l'UCR2, en particular la seva regió N-terminal, que va portar a un increment de l'activitat catalítica de l'enzim. Això indicava que UCR2 podia tenir un efecte inhibitori constitutiu en l'activitat de PDE4 (Jin et al. 1992). Sorprenentment, aquesta part N-terminal de l'UCR2 que interacciona amb l'UCR1 és la que es troba absent en les formes supercurtes de PDE4.





**Figura 3. Estructura dels gens de les diverses variants de les quatre isoformes de PDE4.** Les isoformes llargues contenen dos UCRs, mentre que les isoformes curtes els han perdut per *splicing* alternatiu. Modificat de (Bender and Beavo 2006).

### 3.4.4.2. Regulació per PKA

Les isoformes llargues de les quatre subfamílies de la PDE4 poden ser activades a través de la fosforilació de PKA d'un residu de serina a l'extrem N-terminal a la part final de la regió UCR1 (Sette and Conti 1996). Aquesta fosforilació incrementa l'activitat de PDE4 al voltant del 60% per a les isoformes llargues (MacKenzie et al. 2002).

La fosforilació per PKA de les diverses isoformes de PDE4 porta a l'activació d'aquestes, a una sensibilitat a  $Mg^{2+}$  alterada, a una sensibilitat a rolipram alterada i a la capacitat de modificar la inhibició produïda per ERK (descriu més endavant). Aquest mecanisme de regulació pot explicar en part el mecanisme de dessensibilització cel·lular a la senyalització per AMPc (Oki et al. 2000).

### 3.4.4.3. Regulació per ERK-MAPK

La via de senyalització ERK-MAPK conforma una ruta per la qual diversos factors de creixement i hormones exerceixen els seus efectes en el creixement cel·lular i la supervivència. El tercer subdomini de la unitat catalítica de totes les subfamílies de PDE4, excepte PDE4A, conté un únic motiu consens per ERK que conté un residu de serina que pot ser fosforil·lat per aquesta cinasa (Baillie et al. 2000).

La fosforilació per ERK de les isoformes llargues de PDE4 porta a una inhibició de la seva activitat. En cèl·lules intactes, la inhibició per fosforilació d'ERK pot produir un increment localitzat dels nivells d'AMPc, permetent l'activació de la PKA. D'aquesta manera PKA pot fosforil·lar el residu de serina del domini UCR1 de la PDE4, eliminant així l'efecte inhibitori produït per la fosforilació d'ERK (Hoffmann et al. 1999). Per tant podem dir que l'efecte inhibitori d'ERK és transitori, ja que pot ser revertit ràpidament per l'acció de la PKA.

### 3.4.4.4. PDE4 i Complexes de Senyalització

Una de les característiques de les PDE4 és la seva capacitat per actuar en regions intracel·lulars específiques, formant part de microdominis de senyalització a través d'AMPc. Aquesta acció és deguda a la interacció d'aquets enzims amb diverses proteïnes *scaffold*, receptors, cinases, canals iònics o el sensor d'AMPc Epac, que faciliten la localització de les PDE4 i altres proteïnes efectores en aquests microdominis.

#### 3.4.4.4.1. *Arrestina*

La família del gen de l'arrestina consisteix en quatre membres:  $\beta$ -arrestina 1 i  $\beta$ -arrestina 2, i dos arrestines més del sistema visual (Luttrell and Lefkowitz 2002). Aquestes serveixen com a proteïnes *scaffold* de senyalització, i tenen un paper clau en mecanismes de dessensibilització cel·lular ja que desacoblen els GPCRs dels seus efectors cel·lulars.

Les  $\beta$ -arrestines formen un complex amb els enzims PDE4, facilitant l'enviament d'un enzim capaç de degradar AMPc als llocs de la membrana plasmàtica on es genera aquest AMPc. Les isoformes de les quatre subfamílies de PDE4 poden interaccionar amb  $\beta$ -arrestina1/2, fet que implica que una regió comú en la unitat catalítica de les PDE4 és el lloc d'unió per les  $\beta$ -arrestines (Perry et al. 2002).

### 3.4.4.4.2.AKAPs

Aquestes proteïnes d'ancoratge s'uneixen a PKA, i són capaces de detectar gradients intracel·lulars d'AMPc i generar una resposta compartimentalitzada en les proteïnes diana de PKA associades a o pròximes a elles.

L'habilitat de les PDEs per interaccionar amb les AKAPs ofereixen la possibilitat de poder controlar l'activitat de PKA mitjançant la regulació de les PDEs. Les isoformes llargues de PDE4 poden unir-se a l'AKAP450 a través del domini UCR2, menys la PDE4D3, que s'uneix a una AKAP específica de múscul a través d'una regió N-terminal específica (Dodge et al. 2001; Tasken et al. 2001).

### 3.4.4.5.Distribució tissular

Les quatre isoformes de la PDE4 es troben àmpliament distribuïdes en mamífers. tot i que la PDE4C mostra una expressió més restringida que la resta (**Taula 3**). En el nostre laboratori s'ha estudiat, mitjançant hibridació *in situ*, la distribució de l'ARNm de PDE4A-D en cervell de mamífers (Perez-Torres et al. 2000). PDE4A, PDE4B i PDE4D es presenta una àmplia localització neuroanatòmica, amb una expressió diferencial a nivell regional i cel·lular.

**Taula 3.** Localització de les isoformes de PDE4 a nivell tissular o cel·lular i intracel·lular (Bender and Beavo 2006).

Isoforma	Localització	
	Tissular/Cel·lular	Intracel·lular
<b>PDE4A</b>	Àmpliament expressada; ARNm trobat a molts teixits com el sistema olfatiu, cèl·lules immunes i testicles; alts nivells de les seves variants es troben distribuïts a nivell cerebral	La PDE4A és reclutada als <i>lipid rafts</i> a les cèl·lules T activades; poden interaccionar amb $\beta$ -arrestina
<b>PDE4B</b>	Alts nivells del seu ARNm detectats en diversos teixits; expressió notable en sistema immune i cervell	Pot ser reclutada per interaccionar amb $\beta$ -arrestina; es localitza als <i>lipid rafts</i> en cèl·lules T activades
<b>PDE4C</b>	Expressió més restringida; ARNm localitzat a pulmó, testicles, i línies cel·lulars d'origen neural	Bàsicament citosòlica; pot ser reclutada per $\beta$ -arrestina
<b>PDE4D</b>	ARNm àmpliament distribuït en una gran varietat de teixits; nivells de proteïna alts al cervell; l'expressió de les seves variants sembla ser específica de teixits i regions; les trobem en cèl·lules inflamatòries	Depenent de la variant les podem trobar a la fracció citosòlica o particulada; poden interaccionar amb $\beta$ -arrestina; reclutada als <i>lipid rafts</i> en cèl·lules T activades

Destaquem també la presència de PDE4 en cèl·lules inflamatòries i del sistema immune com neutròfils, macròfags, basòfils, plaquetes, eosinòfils, mastòcits, monòcits i limfòcits B i T. Sembla ser que PDE4C és l'única isoforma que no es troba present en aquestes cèl·lules (Engels et al. 1995).

#### 3.4.4.6. Paper fisiològic de les PDE4

Es coneix força bé el paper fisiològic que exerceixen les PDE4 en els diversos tipus cel·lulars. Almenys una de les isoformes es troba expressada a la majoria de cèl·lules i tenen un paper important en molts processos biològics com la funció cerebral (Bradshaw and Porteous 2010; Li et al. 2011), l'activació de monòcits i macròfags (Shepherd et al. 2004), la infiltració de neutròfils (Ariga et al. 2004), la proliferació de la musculatura llisa vascular (Tilley and Maurice 2002), la fertilitat (McKenna et al. 2005), la vasodilatació (Korkmaz et al. 2009), i la contracció cardíaca (Houslay et al. 2007).

Aquest gran coneixement és degut a la disponibilitat d'alguns inhibidors selectius per aquesta família, i també a l'existència d'animals *knockout* per a tres de les isoformes (PDE4A, 4B i 4D).

Destacarem la importància de les PDE4s en la resposta inflamatòria, ja que aquesta funció és un dels temes centrals d'aquesta tesi.

##### 3.4.4.6.1. *PDE4s en la Resposta Inflamatòria*

Els estudis amb animals *knockout* per les isoformes de PDE4 així com amb inhibidors selectius de PDE4 com el rolipram han estat de gran utilitat pel descobriment del paper regulador d'aquests enzims en la resposta inflamatòria i immune.

Els primers treballs realitzats en cèl·lules del sistema immune durant la resposta inflamatòria a lipopolisacàrid (LPS) van mostrar que rolipram inhibia la producció de TNF- $\alpha$  en monòcits humans perifèrics estimulats *in vitro* amb LPS (Seldon et al. 1995). Aquesta inhibició es caracteritza per un augment dels nivells intracel·lulars d'AMPc juntament amb l'activació de PKA, tot això degut a la prèvia activació del receptor de prostaglandina E<sub>2</sub>. Això es deu a la inhibició de la transactivació de la subunitat p65 del factor de transcripció NF $\kappa$ B, necessari per la transcripció de TNF- $\alpha$  (Takahashi et al. 2002). També es va observar un augment de la producció de citocines de tipus antiinflamatori com IL-10 (Eigler et al. 1998), degut a l'activació de la via PKA/CREB/C/EBP, que permet l'activació del promotor d'IL-10 (Platzer et al. 1995). Més endavant, gràcies als estudis amb ratolins

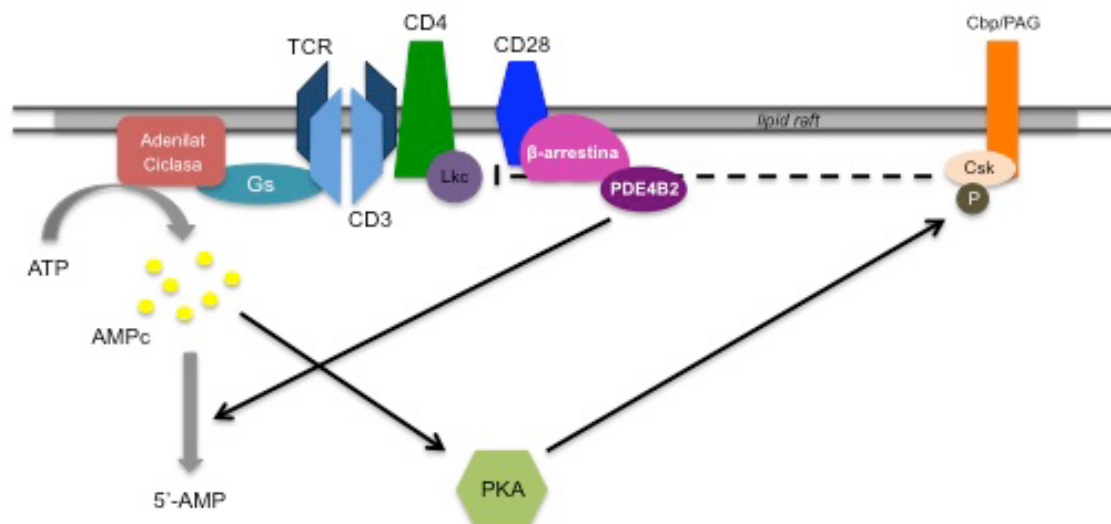
*knockout* per PDE4B, es va descobrir que aquesta isoforma té un paper clau en la resposta inflamatòria, ja que l'estimulació per LPS *in vitro* en monòcits i macròfags no provoca canvis en la producció de TNF- $\alpha$  (Jin and Conti 2002; Jin et al. 2005). El paper de PDE4B en la resposta a LPS és tractat amb més detall en capítols posteriors.

També s'ha demostrat que els inhibidors de PDE4 suprimeixen respostes dels neutròfils, com la producció d'IL-8, la capacitat quimiotàctica i l'adhesió (Au et al. 1998; Sanz et al. 2007). En particular, s'ha observat que PDE4B i PDE4D són les isoformes implicades en el reclutament de neutròfils en un model de dany pulmonar (Ariga et al. 2004).

La família de PDE4 té també un paper clau en la resposta immune dels limfòcits T. En estudis realitzats *in vitro* amb limfòcits T humans s'ha demostrat que PDE4A, PDE4B i PDE4D augmenten la seva expressió degut a l'activació d'aquestes cèl·lules, amb la PDE4D exercint la funció més important (Peter et al. 2007). L'observació que l'estimulació del receptor de cèl·lules T (TCR) provoca un augment dels nivells d'AMPc, juntament amb que nivells elevats d'aquest missatger inhibeixen la funció i proliferació dels limfòcits T, suggereix que la regulació per PDEs podria tenir un paper clau en l'activació de les cèl·lules T (Abrahamsen et al. 2004).

L'activació del limfòcit T només es produeix de forma completa en presència del coreceptor CD28. L'activació de TCR per si sol produeix una activació de la PKA i un augment dels nivells locals d'AMPc intracel·lular. Quan es produeix la unió entre el TCR o CD3 i el CD28, un complex format per  $\beta$ -arrestina i PDE4 és reclutat als *lipid rafts* (**Figura 4**). Per tant, sembla que aquest reclutament de PDE4 mitjançant l'acció de CD28 potencia la resposta immune de les cèl·lules T i contraresta l'efecte inhibitori de l'AMPc en absència del coreceptor (Abrahamsen et al. 2004; Tasken and Stokka 2006).

Estudis anteriors amb tècniques d'immunoprecipitació ja havien pogut demostrar que la PDE4B, i concretament la variant PDE4B2, es troba associada als *lipid rafts* en l'estimulació del TCR (Baroja et al. 1999); i treballs posteriors en cèl·lules T *in vitro* han observat una localització de la proteïna PDE4B2 a la sinapsis immunològica a l'inici de l'activació del limfòcit T, que després es desplaça cap al costat contrari (Arp et al. 2003). Per tant queda clara la implicació de PDE4 en la regulació de l'activació de les cèl·lules T mitjançant la reducció dels nivells d'AMPc.



**Figura 4. Activació dels limfòcits T.** PDE4B2 podria estar regulant els nivells d'AMPc intracel·lular als *lipid rafts* estimulant d'aquesta forma l'activació completa del TCR, que es troba parcialment inhibida per l'acció de PKA, que ve activada per l'AMPc (Abrahamsen et al. 2004).

### 3.4.5.FAMÍLIA PDE5

La PDE5 va ser originalment identificada, aïllada i caracteritzada de les plaquetes (Coquil et al. 1980) i el pulmó (Francis et al. 1980). No obstant, aquesta PDE va passar força desapercibuda fins al descobriment de la seva acció reguladora de la contracció de la musculatura llisa vascular i per ser la diana farmacològica del sildenafil. Per aquest motiu, actualment la PDE5 és coneguda com la diana farmacològica de molts fàrmacs pel tractament de la disfunció erèctil i, més recentment, per la hipertensió pulmonar.

Aquest enzim es caracteritza per ser relativament específic per la hidròlisi de GMPc a nivells baixos de substrat i per la presència de llocs d'unió altament específics per GMPc. Només s'ha trobat un gen per PDE5, PDE5A, encara que tres variants d'aquesta isoforma s'han identificat sota el control diferencial de diversos promotors.

La PDE5A és considerada una proteïna citosòlica. En rosegadors, nivells elevats de l'ARNm de PDE5A s'han localitzat en la musculatura llisa vascular, el cor, la placenta, el múscul esquelètic, el pàncrees, el cervell, el fetge, en diversos teixits gastrointestinals i el pulmó (Loughney et al. 1998). No obstant, els nivells més elevats de PDE5A s'han descrit en cerebel, ronyó i pàncrees (Kotera et al. 2000) i també en pulmó i cor (Giordano et al. 2001). La proteïna PDE5A també la trobem a les plaquetes, on va ser descrita per primera vegada.

La PDE5 és un regulador de la contracció de la musculatura vascular, especialment al penis i al pulmó (Mullershausen et al. 2006); es troba implicat en la senyalització NO-

GMPc a les plaquetes per tal de controlar l'agregació (Ito et al. 1996) i també té un paper en la regulació de la senyalització per GMPc al cervell (Rutten et al. 2005).

### 3.4.6.FAMÍLIA PDE6

Els membres de la família PDE6 són coneguts com les PDEs dels fotoreceptors. Existeixen tres gens a la família, PDE6A, PDE6B i PDE6C; a més, també existeixen les subunitats PDE6  $\gamma$  i PDE6  $\delta$  que modulen l'activitat i la localització d'aquests enzims. Les PDE6s les trobem altament expressades en els segments externs dels fotoreceptors de la retina dels mamífers, on intervenen en la conversió de la senyal lluminosa en una fotoresposta. La PDE6A i la PDE6B s'expressen en els bastons, mentre que la PDE6C la trobem en els cons. En resposta a un fotó de llum absorbit pel fotopigment del con o el bastó, una proteïna G anomenada transducina s'activa per intercanvi GDP-GTP. Llavors la transducina activada interacciona amb la PDE6, provocant la seva activació mitjançant l'eliminació de la subunitat  $\gamma$  inhibidora. La PDE activada hidrolitza ràpidament el GMPc, produint una desactivació d'un canal catiónic dependent de GMPc de la membrana. Això genera una hiperpolarització de la membrana que inicia la fotorresposta de la neurona fotoreceptora (Ridge et al. 2003; Cote 2004).

L'eficiència catalítica d'aquesta família d'enzims és la més elevada de totes les PDEs. Sota un estímul lumínic, la quantitat total de GMPc a la retina pot canviar en menys de 15 milisegons (Goldberg et al. 1983). Això permet a l'animal detectar i respondre de forma extremadament ràpida als canvis d'intensitat de llum, i presenta un gran avantatge en les espècies que tenen la visió com a sentit dominant.

Les PDE6s foren les primeres PDEs en les quals es van detectar mutacions genètiques causants de malalties, com per exemple la ceguesa nocturna estacionària (Gal et al. 1994) i la retinitis pigmentosa (McLaughlin et al. 1993), que afecten a les subunitats  $\alpha$  i  $\beta$  de la PDE6. Es creu que la majoria de mutacions de PDE6 resulten en un mal plegament de la proteïna que porta a una disfunció progressiva i a la mort cel·lular. Qualsevol mutació que incrementi de forma crònica el GMPc en la cèl·lula fotoreceptora pot portar a la seva mort (Farber and Tsang 2003).

S'ha pogut detectar també la presència d'ARNm de PDE6  $\alpha$  i/o PDE6  $\beta$  en teixits que no són la retina, amb una possible implicació durant el desenvolupament embrionari (Wang et al. 2004).



A part de la seva funció en la transducció de senyal a la retina, es creu que la PDE6 també pot estar implicada en la regulació de l'alliberament de melatonina a la glàndula pineal (Morin et al. 2001).

### 3.4.7.FAMÍLIA PDE7

La família PDE7 és altament selectiva per AMPc, especialment a concentracions baixes de substrat. Consisteix en dos gens, PDE7A i PDE7B. No es coneixen dominis reguladors en l'extrem N-terminal com en el cas de la majoria de les PDEs, però s'hi troben llocs consens per la fosforilació de PKA en aquesta regió.

L'ARNm i la proteïna de PDE7 es troben expressats en una àmplia varietat de cèl·lules del sistema immune (Nakata et al. 2002; Smith et al. 2003; Smith et al. 2004)), on la PDE7 té un paper important en l'activació dels limfòcits T (Nakata et al. 2002; Smith et al. 2004). Degut al gran valor de les dianes farmacològiques implicades en els processos inflamatoris, molts esforços s'han centrat en el desenvolupament d'inhibidors selectius de PDE7 i en inhibidors duals PDE4-PDE7.

La  $K_m$  per la hidròlisis d'AMPc és molt baixa, per això es creu que aquests enzims regulen principalment els nivells basals d'AMPc. Ambdues isoformes existents tenen molt poca afinitat per GMPc.

En els humans es coneixen tres variants d'*splicing* de PDE7A (PDE7A1-3), que difereixen entre elles en les seves regions N- i C-terminal. La variant PDE7A2 conté una seqüència N-terminal única que fa que estigui localitzada a la fracció de membrana de les cèl·lules del múscul i el cor (Han et al. 1997). Les tres variants d'*splicing* de PDE7B han estat identificades en rata i també contenen seqüències N-terminal úniques (Sasaki et al. 2002). Aquestes variants regulen la seva transcripció de forma diferencial, ja que només s'ha observat l'activació del promotor de la PDE7B1 en neurones estriatals degut a l'activació de PKA per AMPc. El promotor de PDE7A1 també ha estat caracteritzat i sembla que conté varis elements de resposta a AMPc que contribueixen a la seva activació, i l'activació de PKA en els limfòcits B regula a l'alça la PDE7A (Lee et al. 2002).

L'ARNm de la PDE7A1 el trobem expressat en múltiples teixits incloent els músculs, la melsa, el cervell, el pulmó, el timus, i varies poblacions de limfòcits (Bloom and Beavo 1996). L'ARNm de la PDE7B1 s'ha observat també en diversos teixits com el cor, el cervell, el pulmó, el ronyó, el fetge i els músculs (Gardner et al. 2000), mentre que l'ARNm de la PDE7B2 està restringit als testicles i el de la PDE7B3 només es troba al cor (Sasaki et al. 2002).



Com ja hem mencionat abans, la PDE7 està implicada en l'activació de cèl·lules T i altres cèl·lules inflammatòries (Smith et al. 2004).

### 3.4.8.FAMÍLIA PDE8

La família PDE8 conté dos gens, PDE8A i PDE8B. Ambdues isoformes són específiques per AMPc i tenen una gran afinitat pel seu substrat. Les propietats catalítiques de PDE8A i PDE8B han estat caracteritzades *in vitro*, i s'ha pogut observar que la seva afinitat per AMPc és la més elevada de totes les PDEs (Fisher et al. 1998).

La isoforma PDE8A té múltiples variants produïdes per *splicing* alternatiu i per llocs d'inici de transcripció alternatius. Les múltiples variants de PDE8B es generen per *splicing* alternatiu.

L'ARNm de PDE8A el trobem expressat en gran varietat de teixits, però de forma elevada als testicles, la melsa, l'intestí prim, els ovaris, el colon i el ronyó (Wang et al. 2001). A més, la variant PDE8A1 s'ha detectat en limfòcits T primaris i línies de cèl·lules T (Glavas et al. 2001). L'expressió de PDE8B està més restringida i el seu ARNm el trobem tan sols en cervell i tiroides. La variant PDE8B1 s'expressa només en cervell, mentre que PDE8B3 la trobem per igual a cervell i tiroides (Kobayashi et al. 2003).

La PDE8 té un paper funcional en l'activació de les cèl·lules T (Vang et al. 2010), la funció espermatòica i les cèl·lules testiculars de Leydig (Vasta et al. 2006).

### 3.4.9.FAMÍLIA PDE9

La família PDE9 és una de les PDEs descobertes més recentment. Probablement és la família de PDEs que presenta una major afinitat per GMPc. La PDE9A és l'única isoforma identificada fins ara, però la síntesis del seu ARNm sembla ser molt complexa, ja que se n'han identificat 19 variants i molts ARNm els trobem expressats en múltiples teixits.

La PDE9A funciona com a regulador de la senyal de GMPc a nivell cerebral (van Staveren et al. 2002). La PDE9A es troba possiblement implicada en alguns processos patològics degut a la seva localització dins el genoma, ja que es troba en una regió on hi trobem gens implicats en diverses malalties neurològiques com el trastorn bipolar (Guipponi et al. 1998).

Aquest enzim és força insensible als inhibidors de PDE clàssics, incloent els no selectius. La seqüència d'aminoàcids del domini catalític de PDE9A té un baix grau d'homologia amb els altres dominis catalítics de les PDEs de mamífer, i això podria explicar la insensibilitat de l'enzim pels inhibidors (Fisher et al. 1998).

La regulació del processament de l'ARNm de la PDE9A sembla ser força complex degut a la identificació de 19 variants N-terminals. Totes aquestes variants utilitzen el mateix lloc d'inici de la transcripció, però es produeix un *splicing* alternatiu que generarà ARNm únics en la seva regió amino. Les diferències no es troben ni en el domini catalític ni en cap altre domini regulador conegut.

En general, PDE9A es troba expressada de forma àmplia i s'ha detectat en gairebé tots els teixits analitzats, amb nivells especialment alts en ronyó, cervell, melsa, teixits gastrointestinals varis i pròstata (Fisher et al. 1998; Wang et al. 2003). I encara que l'ARNm de la PDE9A s'hagi trobat expressat àmpliament al cervell de rata i ratolí, els nivells més elevats s'han detectat al bulb olfactiu, el gir dentat, les cèl·lules de Purkinge i el tubercle olfactiu (van Staveren et al. 2002).

Es creu que la funció de PDE9 és la regulació del senyals NO-GMPc a nivell neuronal.

#### 3.4.10.FAMÍLIA PDE10

La família de PDE10 només conté un gen, PDE10A. Fins a l'actualitat, quatre variants d'aquest gen (PDE10A1-4) s'han descrit. Se sap poc sobre la funció de PDE10, però s'han desenvolupat alguns inhibidors selectius per tractament de l'esquizofrènia i el Parkinson.

Els primers articles sobre PDE10 mostraven la seva presència en una àmplia varietat de teixits. Els nivells d'ARNm es troben particularment elevats al cervell, on la senyal més elevada es detecta a l'àrea de l'estriat, però també es troba en abundància al cerebel, el tàlam, l'hipocamp i la medul·la espinal (Fujishige et al. 1999; Loughney et al. 1999; Soderling et al. 1999). També s'han detectat nivells alts els testicles, principalment en els espermatozous en desenvolupament. El transcrit de PDE10 també s'observa en la glàndula tiroidea i la glàndula pituïtària, així com el múscul cardíac.

La PDE10A serveix com a regulador del GMPc al cervell i es creu que té un paper important en l'aprenentatge i la memòria (Piccart et al. 2011).

#### 3.4.11.FAMÍLIA PDE11

La PDE11 és la família d'enzims de PDEs descoberta més recentment (Fawcett et al. 2000). Tan sols un producte gènic, la PDE11A, ha estat identificat. No obstant, quatre variants d'aquest gen han estat descobertes (PDE11A1-4). La PDE11A hidrolitza tant AMPc com GMPc, i no s'ha observat una preferència especial per cap dels dos nucleòtids.

## *Introducció*

El gen de la PDE11A ocupa més de 300 kb d'ADN genòmic i conté 23 exons de curta llargada. Les seves quatre variants tenen diferents extrems amino degut a llocs d'inici de la transcripció diferencials (Hetman et al. 2000).

S'ha demostrat que les variants de PDE11A presenten un patró d'expressió diferencial en els teixits. En humans, l'ARNm de la PDE11A1 es localitza principalment en múscul esquelètic i pròstata (Fawcett et al. 2000). L'ARNm de PDE11A3 es troba específicament als testicles i l'ARNm de PDE11A4 està altament expressat a la pròstata (Yuasa et al. 2000).

Es creu que l'enzim PDE11 podria tenir un possible paper en la funció i el desenvolupament dels espermatozoides (Wayman et al. 2005).

## 4.EL SISTEMA IMMUNE

L'organisme està protegit dels agents infecciosos i el dany que aquests provoques per una varietat de cèl·lules efectores i molècules que de forma conjunta conformem el sistema immune.

Per tant, el sistema immune és l'encarregat de defensar-nos contra les agressions externes. La primera línia de defensa està formada per la **immunitat innata**, que respon de forma general a l'entrada de patògens, però no és capaç de respondre de forma específica ni pot proporcionar una resposta immune específica que previngui la reinfecció. Aquest paper el duu a terme la **immunitat adaptativa**, que es basa en la generació d'un ampli repertori de receptors específics d'antigen en els limfòcits que permeten al sistema immune reconèixer qualsevol antigen forà. Cèl·lules específiques contra aquest antigen proliferen i es diferencien per tal d'eliminar el patogen responsable de la infecció. A més, es generaran cèl·lules de memòria que seran capaces de respondre de forma més ràpida i efectiva en el cas d'una reinfecció.

La regulació de les respostes immunes, tant estimulants-les com suprimint-les (en el cas de les malalties autoimmunes com l'Esclerosis Múltiple), és el principal objectiu en la recerca dins el camp de la immunobiologia.

Les cèl·lules que conformen el sistema immune i que seran les principals protagonistes en la resposta immunològica són les següents:

**Macròfags:** fagociten, activen la resposta inflamatòria i presenten l'antigen.

**Cèl·lules dendrítiques:** capten i presenten l'antigen.

**Neutròfils:** fagociten i activen la resposta inflamatòria.

**Eosinòfils:** eliminen paràsits reconeguts pels anticossos.

**Mastòcits:** alliberen grànuls que contenen histamina i altres agents actius.

**Basòfils:** com els mastòcits, alliberen grànuls d'histamina, serotonina en baixes concentracions i altres substàncies químiques.

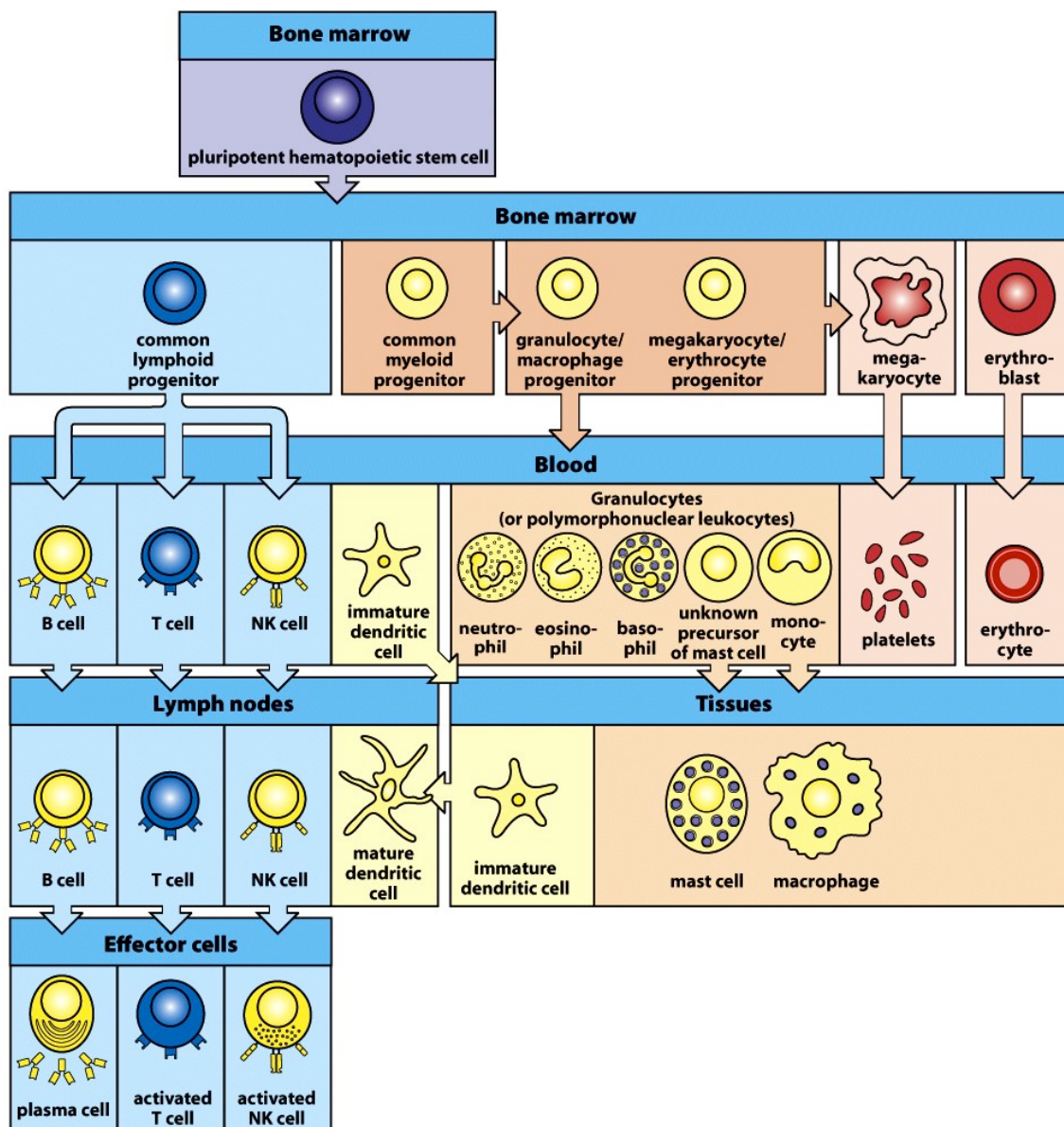
**Cèl·lules B:** s'encarreguen de la generació i producció d'anticossos.

**Cèl·lules T citotòxiques:** maten les cèl·lules infectades per virus i altres patògens intracel·lulars.

**Cèl·lules T helper (Th):** activen a les cèl·lules B i als macròfags.

**Cèl·lules T reguladores (Tregs):** suprimeixen l'activació d'altres limfòcits i ajuden a controlar la resposta immune.

**Cèl·lules NK:** alliberen grànuls que poden produir la mort d'algunes cèl·lules infectades per virus.



**Figura 5.** Llinatge de tots els tipus cel·lular que conformen el sistema immune. Totes les cèl·lules sanguínies, incloent les immunes, provenen d'un únic progenitor, cèl·lules mare hematopoètiques pluripotents procedents de la medul·la òssia. (Modificat del llibre Immunobiology, 7ed., © Garland Science 2008).

## 4.1. IMMUNITAT INNATA

La resposta immune innata és la primera barrera contra la infecció. Els mecanismes de la immunitat innata fan que el gran nombre de microorganismes amb els que estem en contacte diàriament siguin detectats i destruïts en qüestió de minuts a hores.

Té tres objectius principals:

- proporcionar més cèl·lules i molècules efectores al lloc d'infecció per tal d'eliminar els patògens de forma més eficient.
- delimitar la zona d'infecció per evitar que aquesta passi al torrent sanguini.
- promoure la reparació del teixit danyat.

L'habilitat d'aquests mecanismes de discriminar de forma altament efectiva entre el que és propi o forà contribueix a la inducció posterior d'una resposta immune adaptativa apropiada si és necessari.

El sistema immune innat utilitza una sèrie de receptors que reconeixen trets comuns entre la majoria de patògens. Si un microorganisme penetra en un teixit és reconegut mitjançant aquests receptors pels macròfags. La unió del patògen al receptor de superfície porta a la fagocitosis i posterior mort dins del fagosoma.

A part, els macròfags s'activen i alliberen citocines i quimiocines que desencadenaran una resposta inflamatòria i atrauran altres cèl·lules del sistema immune al lloc d'infecció, com per exemple DCs, que fagociten el patògen i son capaces de presentar l'antigen i iniciar una resposta immune adaptativa.

La resposta inflamatòria produirà diversos canvis:

- expressió de molècules d'adhesió en cèl·lules endotelials que permetrà la infiltració de leucòcits al teixit.
- expressió de mediadors d'inflamació (prostaglandines, leucotriens i factor d'activació plaquetària) i citocines (factor de necrosis tumoral, TNF- $\alpha$ ).

#### 4.1.1.PATRONS DE REONEIXEMENT EN EL SISTEMA IMMUNE INNAT

Les cèl·lules que conformen el sistema immune innat expressen receptors que reconeixen el que no es propi i senyalitzen per una resposta cel·lular (revisat a (Janeway and Medzhitov 2002)).

Les molècules que reconeixen aquests receptors s'anomenen patrons moleculars associats a patogen o PAMPs i s'uneixen a receptors de reconeixement de patrons o PRRs.

Els més coneguts i els que tenen una via de senyalització més estudiada són els de la família dels receptors Toll-like (TLRs).

##### 4.1.1.1.Receptors Toll-like (TLRs)

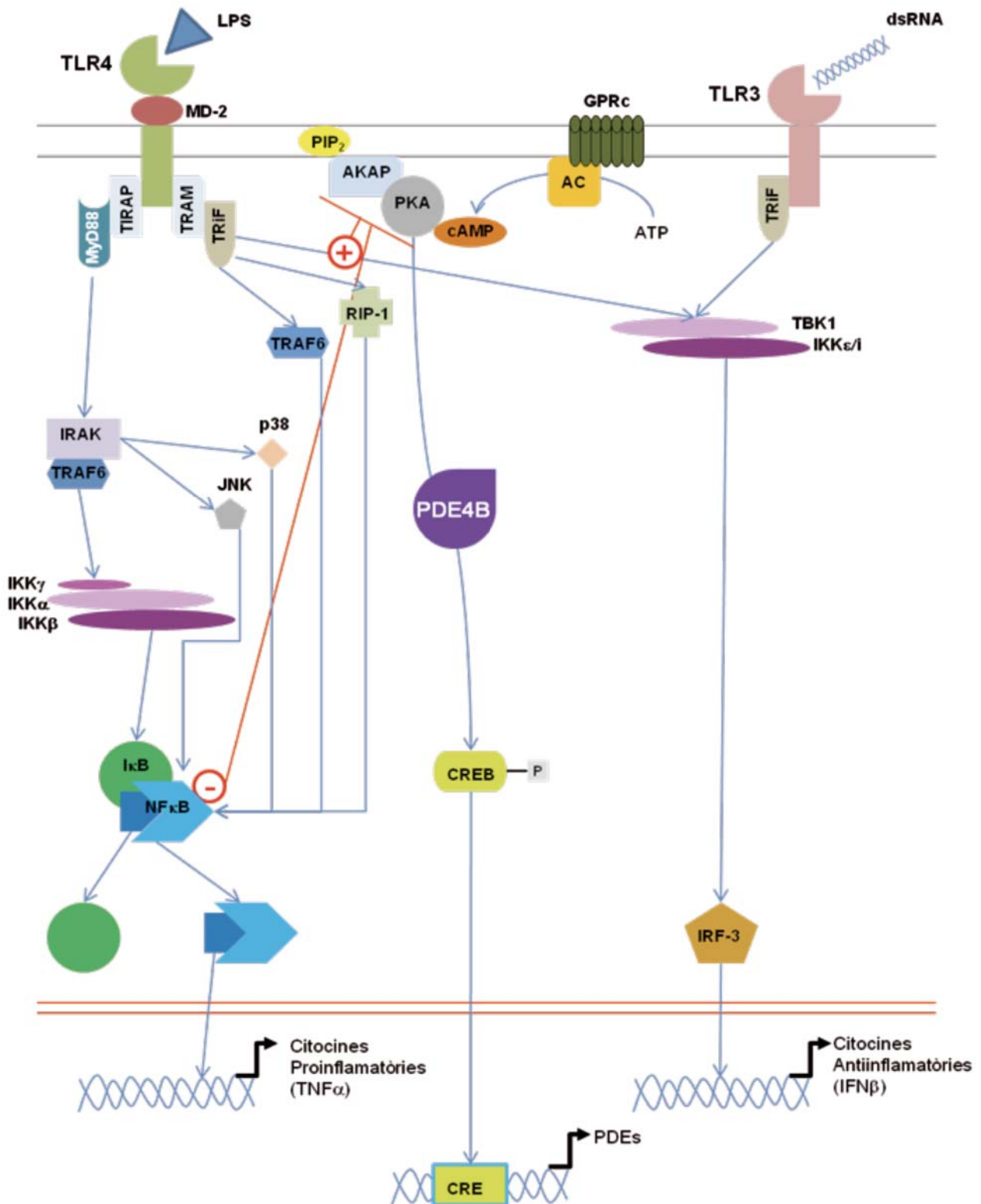
La família de TLR és la millor caracteritzada dels PRRs en mamífers. Els TLRs poden reconèixer diversos PAMPs (Takeda et al. 2003) com el lipopolisàcarid, LPS, (TLR4), lipoproteïnes bacterianes i àcids lipotèics (TLR2), flagelina (TLR5), CpG ADN de bacteris i virus (TLR9), ARN de doble cadena (TLR3) i ARN viral de cadena simple (TLR7).

Un cop unit el PAMP al seu TLR, l'activació de la via de senyalització s'origina en els dominis citoplasmàtics TIR dels receptors. A aquest domini s'hi uneix un adaptador, MyD88, que va ser el primer en caracteritzar-se. Més tard es va descobrir que alguns TLRs podien senyalitzar a través d'una via independent. Per tant es coneix una via dependent de MyD88 comú a tots els TLRs, menys TLR3, i una via independent de MyD88 característica de TLR3 i TLR4 (Dalpke and Heeg 2002).

##### *4.1.1.1.1.Via dependent de MyD88*

MyD88 té un domini TIR a la porció C-terminal i un domini de mort a la part N-terminal. MyD88 s'associa amb el domini TIR del TLR. Després de l'estimulació del receptor, MyD88 recluta el receptor d'IL-1 associat a quinasa (IRAK) al TLR a través de la interacció dels dominis de mort d'ambdues molècules. IRAK s'activa per fosforilació i s'associa a TRAF6, portant a l'activació de dues vies de senyalització diferents, i finalment a l'activació de JNK i NFκB, que portaran a l'expressió de gens de citocines proinflamatòries com TNF-α.





**Figura 6. Vies de senyalització de TLR3 i TLR4.** MyD88 és un adaptador que conté un domini TIR, essencial per la inducció de citocines proinflamàtores via NFκB en tots els TLRs. No obstant, TLR3 i TLR4 senyalitzen també a través d'una via independent de MyD88, que porta a l'activació d'IRF-3 via TBK-1 i IKKε/i, i a l'expressió d'IFN-β. Es creu que PDE4B està implicada en la regulació d'aquestes vies, probablement regulant els nivells d'AMPc, que podria estar activant PKA i aquesta regulant algunes proteïnes de ambdues vies de senyalització. A part, PKA fosforilaria CREB, portant a l'expressió de gens CRE dependents com les PDEs.



### 4.1.1.1.2. Via independent de MyD88

En el cas de TLR3 i TLR4, un altre adaptador, TRIF, s'uneix al domini TIR del receptor. Un cop activat el TLR, TRIF recluta a les quinases TBK-1 i IKK $\epsilon$ /IKK $\delta$ , que osforilaran i activaran el factor de transcripció IRF-3, que portarà a l'expressió de citocines antiinflamatòries com IFN- $\beta$ .

Experiments realitzats en el laboratori del Dr. Conti han pogut demostrar que l'enzim PDE4B té un paper en la via de senyalització de TLR3 i TLR4, ja que l'activació *in vitro* d'aquests TLRs en macròfags de ratolins PDE4B<sup>-/-</sup> bloqueja les vies de senyalització dependents i independents de MyD88 inhibint l'expressió de citocines inflamatòries (**Figura 6**).

Aquests receptors els trobem expressats en abundància en monòcits, tant en cèl·lules dendrítiques com en macròfags, i tenen un paper clau en l'inici de la resposta inflamatòria.

### 4.1.2. RESPOSTA IMMUNE INNATA INDUÏDA EN LA RESPOSTA INFLAMATÒRIA

Les respostes immunes innates poden eliminar de forma eficient la infecció o contenir-la mentre es desenvolupa la resposta immune adaptativa.

Aquesta resposta es caracteritza pel reclutament de cèl·lules al lloc d'infecció per tal d'eliminar els patògens. L'activació dels TLRs indueix l'expressió de selectines, citocines, quimiocines i receptors de quimiocines, entre d'altres, que regularan aquesta migració cel·lular.

Les **citocines** són secretades pels macròfags activats. Poden actuar d'una forma autocrina, afectant el comportament de la cèl·lula que ha alliberat la citocina; de forma paracrina, afectant el comportament de cèl·lules adjacents; i algunes citocines són el suficientment estables que poden actuar de forma endocrina, afectant el comportament de cèl·lules més distants, tot i que això dependrà de la capacitat de la citocina per entrar al torrent sanguini i de la seva vida mitjana a la sang (Ozato et al. 2002). Els macròfags poden secretar diverses citocines, com l'interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-12 i TNF- $\alpha$ . El reconeixement de diferents classes de patògens mitjançant diversos TLRs resultarà en la inducció variant d'algunes d'aquestes citocines. Per exemple la secreció de TNF- $\alpha$ , degut a l'activació de TLR4, és particularment important en contenir la infecció.

Entre les citocines alliberades en els teixits durant les primeres fases de la infecció hi trobem a membres de la família de citocines quimioatracients anomenades **quimiocines**. Aquestes petites molècules indueixen quimiotaxis en cèl·lules responents properes. Totes les quimiocines estan relacionades a nivell de seqüència aminoacídica, i els seus receptors són proteïnes transmembrana acoplades a proteïna G. Les quimiocines funcionen com a quimioatracients pels leucòcits, reclutant a monòcits, neutròfils i altres cèl·lules efectores des de la sang al lloc d'infecció. Poden ser alliberades per diversos tipus cel·lulars i serveixen de guia a les cèl·lules implicades en la immunitat innata. També guien als limfòcits en la resposta immune adaptativa (Ono et al. 2003).

Però les quimiocines no actuen soles en el reclutament cel·lular. Necessiten també l'acció de mediadors vasoactius que aproximen els leucòcits a l'endoteli dels vasos sanguinis, i citocines com TNF- $\alpha$  que indueixin l'expressió de les molècules d'adhesió necessàries en les cèl·lules endotelials.

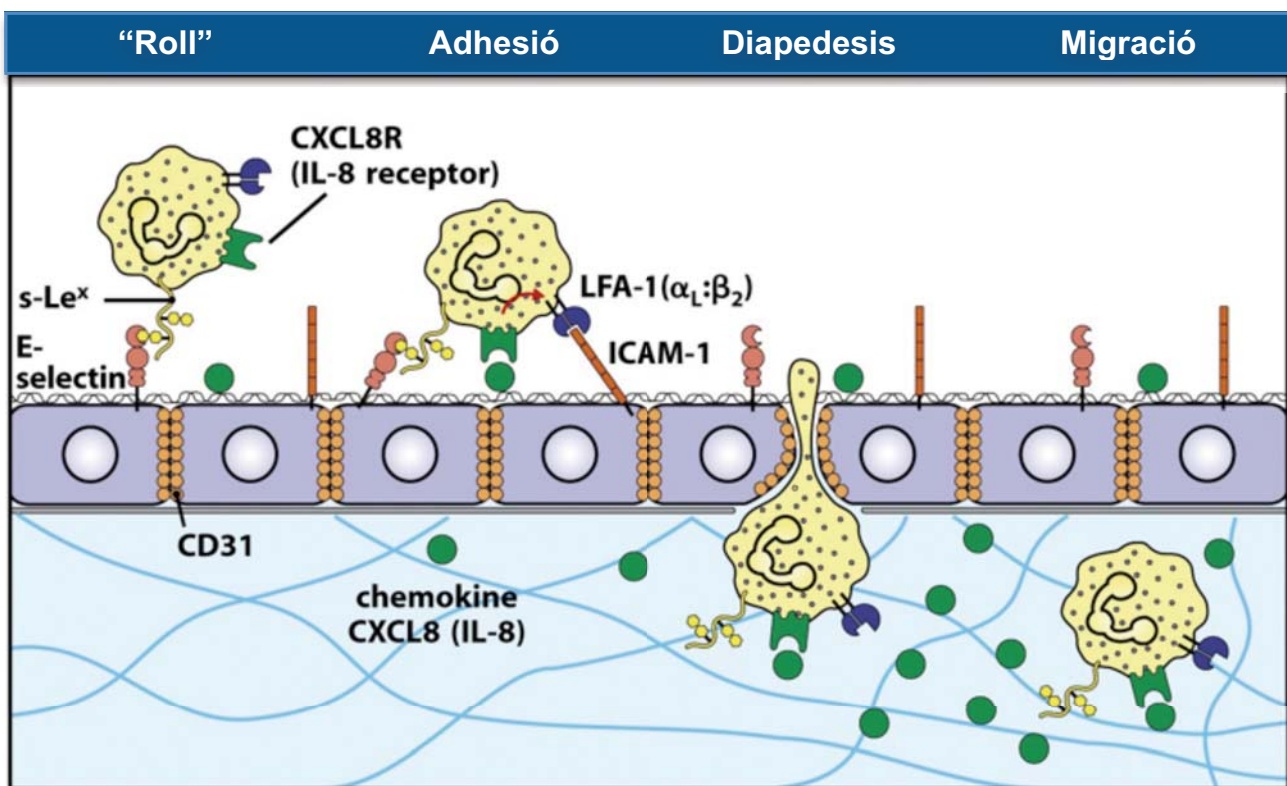
Tres famílies de molècules d'adhesió són importants pel reclutament leucocitari. La família de les **selectines**, membres de la qual s'indueixen en l'endoteli activat i inicien interaccions entre l'endoteli i els leucòcits mitjançant la unió als lligands expressats en els leucòcits circulants.

El següent pas en el reclutament de leucòcits depèn d'adhesions més fortes, degudes a la unió de molècules d'adhesió intercel·lular (ICAMs) de l'endoteli, que formen part de la **superfamília de les immunoglobulines**, i les proteïnes leucocitàries de la família de les **integrines**. Aquestes adhesions són promogudes per la inducció d'ICAM-1 en l'endoteli activat i l'activació d'un canvi conformacional en el seu lligand degut a la unió de quimiocines en els leucòcits. L'activació de l'endoteli és causat per interaccions amb citocines alliberades per macròfags, principalment TNF- $\alpha$ .

El procés de migració dels leucòcits a través dels vasos sanguinis, conegut com a extravessament, té lloc en quatre passos (revisat a (Alon and Feigelson 2002)). El primer pas implica a les selectines. Al detectar els senyal inflamatoris, els leucòcits rodolen ("**roll**") per la superfície de les cèl·lules endotelials, un procés mediat per les selectines expressades en l'endoteli. Les selectines s'expressen ràpidament a la superfície d'aquestes cèl·lules per l'activació a través dels TLRs o del TNF- $\alpha$  secretat pels macròfags. Després, l'activació dels TLRs condueix a la secreció de quimiocines, que s'uneixen a la superfície de l'endoteli vascular potenciant l'activació dels leucòcits

## Introducció

mitjançant la inducció de canvis conformationals de les integrines. Aquestes permetran l'**adhesió** dels leucòcits a la paret dels vasos de forma irreversible. L'expressió dels lligands de les integrines ve induïda també per l'activació de TLRs o indirectament per TNF- $\alpha$  o IL-1 $\beta$  secretats pels macròfags. En el tercer pas el leucòcit travessa la paret endotelial, un procés conegut com **diapedesis**. Hi participen les integrines, a més d'altres molècules d'adhesió de la superfamília de les immunoglobulines, que s'expressen tant en leucòcits com en les unions intercel·lulars de les cèl·lules endotelials. Llavors penetren a la membrana basal mitjançant l'ajuda d'enzims que trenquen les proteïnes de la matriu extracel·lular. El quart i últim pas és la **migració** dels leucòcits a través del teixit sota la influència de les quimiocines (**Figura 7**).



**Figura 7. Procés de migració dels leucòcits a través dels vasos sanguinis.** Aquests procés té lloc en quatre passos: "roll", adhesió, diapedesis i migració, tots ells regulats per quimiocines i diverses molècules d'adhesió. (Modificat del llibre Immunobiology, 7ed., © Garland Science 2008).

## 4.2. IMMUNITAT ADAPTATIVA

La resposta immune adaptativa s'indueix quan una infecció no pot ser resolta mitjançant els mecanismes de defensa innats. El patògen continua replicant-se i l'antigen s'acumula. Juntament amb els canvis en l'ambient cel·lular produïts per la immunitat innata, això desencadena la resposta immune adaptativa.

Aquesta resposta s'inicia en els òrgans limfàtics perifèrics (nòduls limfàtics, melsa i teixits limfàtics associats a mucoses). Això significa que les cèl·lules T naïf específiques per l'antigen apropiat necessiten trobar-se amb les DCs que presenten aquest antigen en els òrgans limfàtics perifèrics (Itano and Jenkins 2003). D'aquesta manera, cada cèl·lula T té una alta probabilitat de trobar-se antígens derivats de qualsevol patògen que hagi produït una infecció en qualsevol teixit del cos.

Quan una cèl·lula T naïf reconeix el seu antigen específic a la superfície d'una DC madura, deixa de migrar. Prolifera durant diversos dies, quan es produeix una expansió clonal i diferenciació, i dona lloc a un clon de cèl·lules T efectores específiques per un únic antigen. Al final d'aquest període, les cèl·lules T efectores esdevenen capaces de sortir per les vies limfàtiques eferents i tornar a entrar al torrent sanguini, des d'on migraran als llocs d'infecció.

L'entrada de les cèl·lules T naïf als òrgans limfàtics requereix l'acció de quimiocines i molècules d'adhesió (von Andrian and Mempel 2003), de forma molt similar a la migració dels leucòcits descrita anteriorment.

La distribució de l'antigen des del lloc d'infecció fins al teixit limfàtic més pròxim es duu a terme a través de la resposta immune innata. La reacció inflamatòria incrementa la taxa d'entrada de plasma als teixits infectats i això incrementa el drenatge de fluid extracel·lular en el sistema limfàtic, portant amb ell els antígens lliures. Però aquests antígens també poden ser captats per les DC madures al lloc d'infecció (Caux et al. 2000).

Les DC immadures residents dels teixits són activades via els seus TLRs, que senyalitzen la presència de patògens, el dany cel·lular o la producció de citocines durant la resposta inflamatòria. Les DCs responen a aquests senyals migrant als òrgans limfàtics i expressant molècules co-estimuladores que són necessàries, a part de l'antigen, per l'activació de les cèl·lules T naïf (Guermonprez et al. 2002).

Les DCs provenen de progenitors mieloides i limfàtics de la medul·la òssia, i migren a través de la sang cap als teixits de tot el cos i també directament als òrgans limfàtics perifèrics. Les cèl·lules dendrítiques es classifiquen en dos subtipus:

- **Cèl·lules dendrítiques convencionals (cDC):** aquelles DCs que sembla que participen més activament en la presentació d'antigen i en l'activació de les cèl·lules T naïf.
- **Cèl·lules dendrítiques plasmacitoides (pDC):** una línia diferent de DCs que produeixen grans quantitats d'interferons, particularment en resposta a infeccions virals, però que no semblen ser importants per l'activació de les cèl·lules T naïf.

Les DCs poden captar l'antigen, principalment, mitjançant dos mecanismes, i presentar-lo llavors a les cèl·lules T a través de les molècules del **complex major d'histocompatibilitat** o **MHC**. La primera ruta de captació d'antigen és a través de receptors fagocítics, que reconeixen una gran varietat de bacteris i virus. Els antígens captats entren llavors a la via endocítica de la cèl·lula, on són processats, i es presenten a través de les molècules MHC de classe II per tal que siguin reconeguts per les cèl·lules T CD4 (Blander and Medzhitov 2006).

Una altra ruta és l'entrada directa del patògen al citosol, com en el cas de la infecció vírica (revisat a (Colonna et al. 2004). Els virus entren al citoplasma i sintetitzen les seves pròpies proteïnes mitjançant la maquinària de la DC, portant a la generació de pèptids virals que podran ser presentats a la superfície mitjançant les molècules MHC de classe I i seran reconeguts per les cèl·lules T CD8.

Les DCs també són capaces de presentar antígens de fongs i paràsits, a part dels de bacteris i virus.

La senyalització a través dels TLRs, a més d'activar les DCs immadures, produeix una alteració significativa en els receptors de quimiocines expressats per les DCs, que facilita la seva entrada als teixits limfàtics perifèrics. També s'ha pogut demostrar que l'eficiència en el processament de l'antigen es pot veure altament incrementada per senyals procedents de la via de TLR, augmentant el nombre de complexos pèptid:MHC en presència de lligands de TLRs.

Les DC madures també poden presentar alguns pèptids propis de l'organisme, la qual cosa pot presentar un problema en el manteniment de la tolerància. No obstant, existeixen

certs mecanismes de regulació per evitar respostes no desitjades. Els receptors de cèl·lules T que reconeixen antígens propis són eliminats en primera instància a nivell del timus; les DCs dels teixits que al final de la seva vida no han estat mai activades per patògens tornen als teixits limfàtics locals; i si aquestes DCs presenten proteïnes pròpies, aquestes no activen a les cèl·lules T perquè no expressen les molècules co-estimuladores necessàries.

Els macròfags són una altre tipus cel·lular com pot actuar com a cèl·lules presentadores d'antigen (revisat a (Underhill et al. 1999)). Els macròfags que han fagocitat microorganismes però han estat incapaços de destruir-los, contribueixen a la resposta adaptativa immune com a cèl·lules presentadores d'antigen. De forma sinèrgica, la resposta immune adaptativa potencia la capacitat fagocítica i microbicida d'aquestes cèl·lules per tal que puguin eliminar el patogen. Els macròfags quiescents no expressen molècules MHC, però el reconeixement de patògens mitjançant receptors tipus TLRs potencia l'expressió de molècules MHC de classe II i afavoreix la presentació de l'antigen.

Passa el mateix amb les cèl·lules B. Aquest tipus cel·lular capta molècules solubles a través de les immunoglobulines de superfícies, les internalitza, i després les presenta formant complexos pèptid:MHC de classe II (Shirota et al. 2002).

#### 4.2.1. ACTIVACIÓ DE LES CÈL·LULES T PER LES APCs

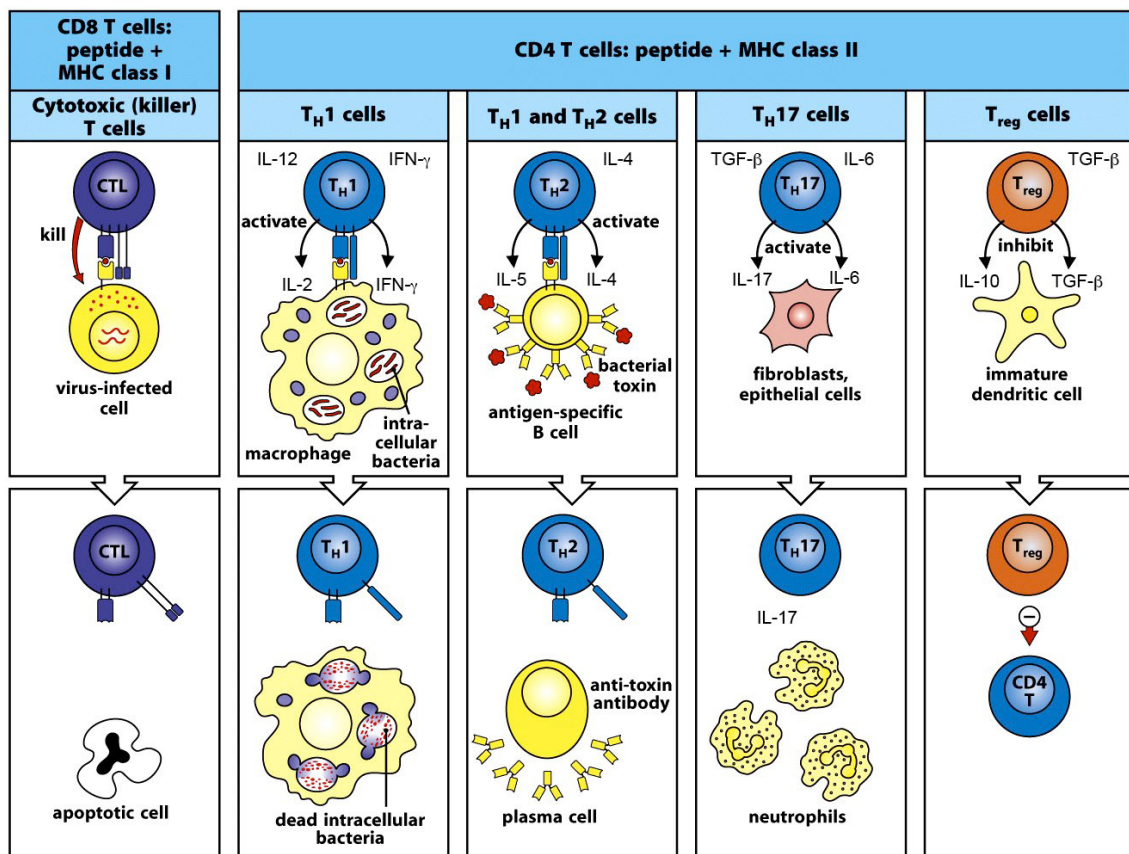
L'activació i diferenciació de cèl·lules T naïf, el que s'anomena *priming*, genera una sèrie de cèl·lules T efectores. El *priming* de les cèl·lules T CD8 naïf genera cèl·lules T citotòxiques capaces d'eliminar de forma directa les cèl·lules infectades per patògens. En el cas de les cèl·lules CD4, deriven a diversos tipus de cèl·lules efectores depenent del tipus de senyals que reben durant el *priming*. Les activitats efectores de les CD4 poden incloure citotoxicitat, però bàsicament secreció de citocines que generen una resposta concreta a la cèl·lula diana.

Mentre van migrant, les cèl·lules T naïf es van unint de forma transitòria a cada APC que troben, i aquesta interacció ve donada per diferents molècules d'adhesió expressades a ambdós tipus cel·lulars (revisat a (Bromley et al. 2001)). Aquesta unió transitòria és crucial a l'hora de donar temps suficient a la cèl·lula T per escrutar el gran nombre d molècules de MHC de cada APC buscant un pèptid específic. En aquells casos en els quals la cèl·lula T naïf reconeix un complex pèptid:MHC, la senyalització a través del receptor de la cèl·lula T (TCR) indueix canvis conformacionals en algunes molècules d'adhesió



augmentant la seva afinitat. D'aquesta manera s'estabilitza l'associació entre la cèl·lula T específica per l'antigen i l'APC que el presenta.

L'APC dona tres tipus de senyals a les cèl·lules T naïf per la seva expansió i diferenciació. El primer senyal deriva de la interacció entre el complex pèptid:MHC i el TCR. El segon senyal és degut a co-receptors (CD4 i CD8) i molècules co-estimuladores, implicats principalment en promoure (o inhibir) la supervivència i l'expansió de les cèl·lules T (Gonzalo et al. 2001). El tercer senyal, dut a terme per les citocines, es veu implicat en la diferenciació de les cèl·lules T en diverses subpoblacions de cèl·lules efectores.



**Figura 8. Cèl·lules T efectores en la resposta immune adaptativa.** Les cèl·lules T, un cop activades, es diferencien en diverses subpoblacions, cadascuna amb una funció efectora concreta i amb un perfil d'alliberació de citocines determinat. (Modificat del llibre Immunobiology, 7ed., © Garland Science 2008).

Després de la fase proliferativa, les cèl·lules T actives es diferencien en cèl·lules T efectores capaces de sintetitzar les molècules efectores necessàries per la seva funció específica com a cèl·lules T *helper* o citotòxiques (revisat a (Abbas et al. 1996)). A més, un cop diferenciades, la unió de la cèl·lula T amb el seu antigen específic resulta en un atac immune sense la necessitat de molècules co-estimuladores (London et al. 2000). També es produeixen canvis en l'expressió de molècules d'adhesió i els seus receptors, permetent que aquestes cèl·lules s'infiltrin als llocs d'infecció (Dustin 2001).

Les cèl·lules T es diferencien en dos grans grups: les que expressen el co-receptor CD4 a la seva superfície i les que expressen el co-receptor CD8. A la vegada, les cèl·lules T CD4 es poden diferenciar en diverses subpoblacions: Th1, Th2, Th17 i cèl·lules T reguladores (Tregs). La seva diferenciació i funció ve resumida a la **Figura 8**.

#### 4.2.1.1. Cèl·lules T CD8 citotòxiques

Són importants en la defensa contra patògens intracel·lulars, especialment virus. Reconeixen complexos pèptid:MHC de classe I a la superfície de les cèl·lules infectades. El principal mecanisme d'acció d'aquestes cèl·lules és l'alliberació  $\text{Ca}^{+2}$ -dependent de grànuls citotòxics un cop han reconegut l'antigen a la cèl·lula diana. Alliberen tres tipus de proteïnes citotòxiques: granzims, que indueixen l'apoptosis de la cèl·lula infectada; perforines, que actuen afavorint l'alliberació dels granzims; i granulines. També poden produir apoptosis mitjançant la via de Fas. Produeixen també citocines com  $\text{IFN-}\gamma$ , que inhibeix la replicació viral i indueix l'expressió de molècules MHC de classe I i l'activació de macròfags (revisat a (Barry and Bleackley 2002)).

#### 4.2.1.2. Cèl·lules Th1

Les cèl·lules Th1 tenen una funció dual. Una d'aquestes funcions és controlar els bacteris fagocitats pels macròfags però que han evitat els mecanismes d'eliminació de patògens. Les Th1 reconeixen els antígens bacterians presentats a la superfície dels macròfags infectats, els activen i estimulen la seva maquinària microbicida per tal d'eliminar el bacteri (Monney et al. 2002). La segona funció és estimular la producció d'anticossos contra patògens extracel·lulars mitjançant la generació de senyals co-estimuladors pels limfòcits B (revisat a (Ozdemir et al. 2010)).

L'activació dels macròfags es produeix per l'alliberació de molècules com  $\text{IFN-}\gamma$  per part de les cèl·lules Th1. Això produeix la secreció de  $\text{TNF-}\alpha$  per part dels macròfags, que actuarà de forma sinèrgica amb l' $\text{IFN-}\gamma$ . Les Th1 també alliberen  $\text{TNF-}\alpha$ , que activa l'endoteli i afavoreix la infiltració de macròfags als llocs d'infecció.

Les Th1 produeixen una gran varietat de citocines, quimiocines i molècules de superfície que no només activen als macròfags infectats, sinó que maten els macròfags quiescents infectats de forma crònica, estimulen la producció de nous macròfags a la medul·la òssia i recluten macròfags circulants al lloc d'infecció. D'aquesta manera, les Th1 controlen i coordinen la defensa de l'organisme contra els patògens intracel·lulars.



### 4.2.1.3. Cèl·lules Th2

Les Th2 activen a les cèl·lules B naïf. Estimulen la generació i la producció d'anticossos de la classe IgE per part de les cèl·lules B, la primera funció de les quals és lluitar contra infeccions parasitàries. L'IgE és també l'anticòs responsable de les reaccions al·lèrgiques.

Per tant, la funció d'aquestes cèl·lules és estimular la producció d'anticossos específics per part dels limfòcits tipus B i ajudar en la generació de la resposta humoral (revisat a (Ozdemir et al. 2010)).

### 4.2.1.4. Cèl·lules Th17

És una de les primeres poblacions a ser induïda en la resposta immune adaptativa a patògens extracel·lulars. Estan implicades en estimular la resposta dels neutròfils per tal d'ajudar en l'eliminació d'aquests patògens.

S'ha descrit, en els últims anys, un paper clau d'aquestes cèl·lules en els mecanismes patològics de malalties autoimmunes com l'Esclerosis Múltiple. Per aquest motiu la funció de les Th17 en aquesta malaltia serà tractada en capítols posteriors.

### 4.2.1.5. Cèl·lules Tregs

La seva funció és suprimir les respostes de les cèl·lules T. Estan implicades en limitar la resposta immune i en prevenir respostes autoimmunes. Existeixen dos grups de Tregs. Un grup esdevé regulador quan les cèl·lules encara es troben al timus i es coneix com a Tregs naturals. L'altre grup s'anomena Tregs adaptatives i es diferencien a partir de les cèl·lules T CD4 naïf de la perifèria sota ambients de citocines concrets.

Aquestes últimes tenen un paper regulador clau en Esclerosis Múltiple i la seva funció es troba descrita en capítols posteriors.

Les diverses subpoblacions de cèl·lules T CD4 (Tregs, Th17, Th1 i Th2) tenen diferents funcions cadascuna. Les Tregs mantenen la tolerància i limiten la immunopatologia, mentre que les Th17 amplifiquen la inflamació aguda als llocs d'infecció. Les cèl·lules Th1 són crucial per la immunitat cel·lular a través de cèl·lules fagocítiques, i també ajuden a la producció d'anticossos. Les Th2 potencien la producció d'alts nivells d'anticossos neutralitzants (IgG i IgA), o IgE, i l'activació de mastòcits. A més, poden regular-se unes a altres mitjançant la producció de citocines.

Si una subpoblació concreta és activada primer i de forma preferencial, pot llavors suprimir el desenvolupament d'una altra subpoblació. Per aquest motiu certes respostes, especialment les cròniques, són dominades per Th1 o bé Th2, i un cop una subpoblació esdevé dominant és difícil canviar la resposta cap a l'altra (revisat a (Kidd 2003)).

#### 4.2.2.MEMÒRIA IMMUNOLÒGICA

Quan una infecció es resol de forma eficient pel sistema immune adaptatiu es produeix la mort de la majoria de cèl·lules efectores i es generen cèl·lules de memòria. Els estímuls específics que havien reclutat les cèl·lules efectores desapareixen i aquestes entren en apoptosi. Les cèl·lules mortes són ràpidament eliminades per cèl·lules fagocítiques. Per tant, el final de la infecció no porta només a l'eliminació del patogen, sinó també a la pèrdua de la majoria de cèl·lules efectores específiques. No obstant, algunes cèl·lules efectores es mantenen, esdevenint cèl·lules T i B de memòria. Aquestes permetran al sistema immune respondre de manera més ràpida i eficient als patògens que ja hagin entrat en contacte prèviament amb el nostre organisme (revisat a (Lanzavecchia and Sallusto 2005)).

## 5. L'AMPc EN LA RESPOSTA IMMUNE

Canvis específics en l'ambient extracel·lular són captats pel sistema immune i resulten en l'activació de les cèl·lules immunes. Aquestes es comuniquen amb el seu ambient a través d'una gran varietat de receptors de superfície que reconeixen i uneixen molècules presents en l'ambient extracel·lular. Aquests receptors, a través de diferents vies de senyalització intracel·lular, produiran una resposta cel·lular a través d'alteracions de l'expressió gènica.

Uns d'aquests receptors els conformen la família de receptors de membrana acoblats a proteïna G, que al activar-se produeixen la síntesis d'AMPc com a missatger secundari. Pèptids bacterians, mediadors de la resposta inflamatòria i quimiocines senyalitzen a través d'aquesta família de receptors.

Alguns dels receptors acoblats a proteïna Gas més coneguts tenen com a lligands l'epinefrina i la norepinefrina, la histamina, la serotonina i algunes prostaglandines (PGE<sub>2</sub> i PGI<sub>2</sub>). Pel contrari, entre els lligands de receptors acoblats a Gai, que inhibeixen l'AC i la producció d'AMPc, trobem algunes quimiocines i alguns leucotriens.

Just després del seu descobriment, l'AMPc es va mostrar com un missatger secundari que actuava en resposta a una gran varietat d'hormones, mediadors inflamatoris i citocines, i que modulava la resposta inflamatòria immune *in vivo* i un gran nombre de processos cel·lulars *in vitro*.

Al lloc d'inflamació, els mastòcits són estimulats i alliberen els seus grànuls mediadors vasoactius i altres mediadors inflamatoris. Els leucòcits circulants s'adhereixen a l'endoteli vascular i s'acumulen a la zona de la infecció degut a la senyalització de factor quimiotàctics. Els estímuls fagocítics produeixen l'alliberació d'enzims lisosomals i ROS en neutròfils, eosinòfils i macròfags. El reconeixement d'antígens específics estimula la proliferació i la diferenciació de diverses subpoblacions limfocitàries. Diversos treballs han provat que nivells elevats d'AMPc redueixen: l'alliberació d'histamina i leucotriens per part de mastòcits (Shichijo et al. 1999; Jin et al. 2010); el moviment de monòcits i neutròfils (Jin et al. 2010); l'alliberació d'enzims lisosomals, ROS, factor d'activació plaquetària i leucotriens per part dels neutròfils (Steadman et al. 1996); l'alliberació de ROS dels eosinòfils (Ezeamuzie and Taslim 2008); l'alliberació de citocines i NO en macròfags (Chio et al. 2004); la proliferació dels limfòcits (Duhant et al. 2002); i les funcions efectores dels limfòcits T citotòxics (Kadoshima-Yamaoka et al. 2009). No obstant, s'ha de tenir en

compte que la capacitat dels nivells elevats d'AMPc per suprimir certes funcions cel·lulars no és uniforme, i depèn bàsicament de l'estímul inicial.

Es creu que l'AMPc és part d'un mecanisme endogen per inhibir la resposta inflamatòria i prevenir que els efectes beneficiosos d'una inflamació aguda progressin a una inflamació crònica i a la destrucció tissular que hi ha associada.

Però també cal tenir en compte que moltes situacions patològiques que predisposen a infeccions estan associades a increments dels nivells d'AMPc, i que estratègies terapèutiques per interrompre la generació i/o l'acció de l'AMPc tenen un gran potencial immunoestimulador.

### **5.1. AMPc i LA RESPOSTA IMMUNE INNATA**

Incrementos de l'AMPc intracel·lular suprimeixen la funció immune de monòcits, macròfags i neutròfils, el que col·lectivament coneixem com a fagòcits, a través de la modulació de tres funcions efectores claus en aquestes cèl·lules: la generació de mediadors d'inflamació (ex: quimiocines i citocines); la fagocitosis; i l'eliminació intracel·lular dels patògens fagocitats. La funció de les DCs, importants adaptadors cel·lulars de la immunitat innata i adquirida, també és altament susceptible a la regulació per AMPc (Aronoff et al. 2006). La majoria de mediadors de la immunitat innata actuen a través de receptors acoblats a proteïna G $\alpha$ i i els seus efectes immunomoduladors depenen de la reducció dels nivells d'AMPc.

Els leucòcits responen a la invasió microbiana mitjançant la producció d'una sèrie de mediadors proinflamatoris i antiinflamatoris. Nivells elevats d'AMPc intracel·lular suprimeixen l'expressió de citocines proinflamatòries com TNF- $\alpha$  i IL-12 (van der Pouw Kraan et al. 1995; Aronoff et al. 2006); quimiocines (Aronoff et al. 2006); i leucotriens (Luo et al. 2004). Pel contrari, l'AMPc induïx la producció de citocines antiinflamatòries com IL-10 i estimula l'expressió de proteïnes supressores de la senyalització de citocines en cèl·lules mononuclears perifèriques i neutròfils (Gasperini et al. 2002). Els efectes de l'AMPc en la generació de mediadors d'inflamació es creuen deguts a la via de PKA principalment.

L'AMPc modula també el procés de fagocitosis mitjançant diversos tipus de receptors. Nivells elevats d'AMPc intracel·lular suprimeixen la fagocitosis induïda per receptors de complement, receptors Fc $\gamma$  i receptors tipus *scavenger* (Makranz et al. 2006). També s'ha pogut demostrar que l'AMPc pot inhibir i també promoure la reestructuració del

citoesquelet d'actina durant la fagocitosis induïda per Fc $\gamma$  (Zalavary and Bengtsson 1998; Ydrenius et al. 2000). La inhibició de l'activitat fagocítica per AMPc pot venir també modulada per la regulació de l'expressió dels receptors fagocítics.

Nivells elevats d'AMPc també supprimeixen la capacitat microbicida dels leucòcits per bacteris, virus, fongs i paràsits. Dianes potencials per la regulació a través d'AMPc inclouen la producció i l'alliberació de ROS (Nogueira-Machado et al. 2006) i NO (Chang et al. 2006), l'acció del fagosoma, i l'alliberació d'enzims lisosomals (Di et al. 2006; Kalamidas et al. 2006).

### 5.2. AMPc i LA RESPOSTA IMMUNE ADAPTATIVA

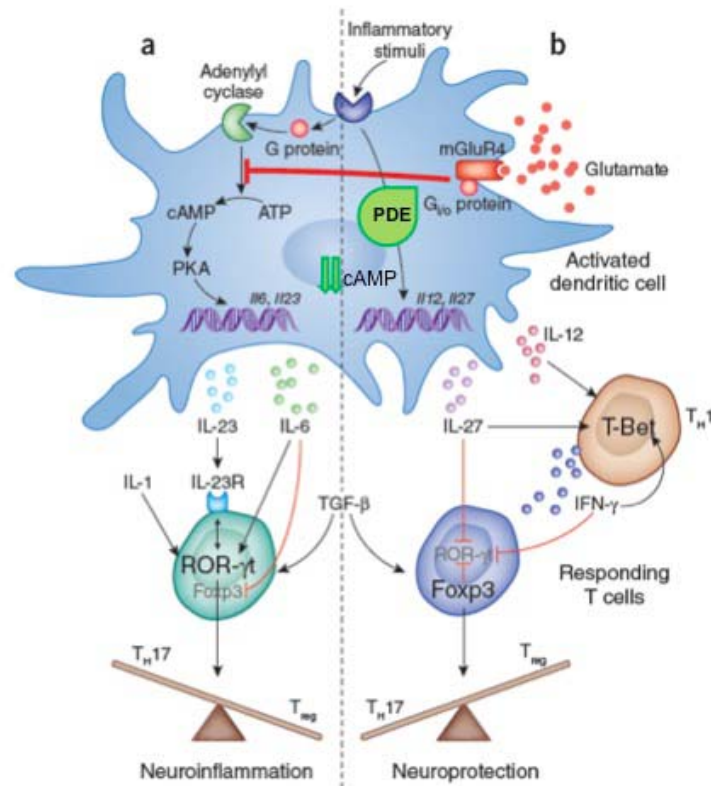
L'AMPc modula la resposta immune adaptativa mitjançant la inhibició de la proliferació de les cèl·lules T induïda pel receptor de cèl·lules T (TCR) (Kammer 1988). Els efectes de l'AMPc en aquestes cèl·lules són deguts a l'activació de la via de PKA. L'activació del TCR, però, no és suficient per la plena activació de la cèl·lula T *in vivo*. Necessita de l'estimulació simultània del co-receptor CD28, que prevé la mort cel·lular i promou la producció d'IL-12 i l'expansió clonal dels limfòcits T (Acuto and Michel 2003). En el sistema immune, PGE<sub>2</sub> i altres lligands que incrementen els nivells d'AMPc unint-se als GPCRs inhibeixen l'activació de cèl·lules T induïda per TCR exercint importants funcions immunoreguladores.

Encara que la PKA pugui modular la senyalització a través del TCR a diversos nivells (revisat a (Torgersen et al. 2002)), els efectes inhibitoris de l'AMPc observats degut a la fosforilació del TCR, suggereixen un paper important de Csk, enzim diana de la PKA.

Les proteïnes implicades en la senyalització del TCR es troben localitzades als *lipid rafts*, regions de la membrana amb dominis de lípids resistents a detergents. Quan el TCR s'uneix al seu lligand, aquesta unió resulta en una ràpida producció d'AMPc als *lipid rafts*, resultant en una activació de la PKA associada a aquestes regions. Però quan es produeix una co-estimulació per CD28, els nivells d'AMPc disminueixen (Abrahamsen et al. 2004). Per tant, la producció d'AMPc induïda per TCR ha d'anar acompanyada per una degradació d'aquest segon missatger per tal que es produeixi una activació completa de la cèl·lula T.

En el cas de les DCs, encarregades de la presentació de l'antigen a les cèl·lules T, els nivells d'AMPc són capaços de modular la producció de citocines. Nivells elevats d'AMPc en aquestes cèl·lules promouen l'alliberació de citocines proinflamatòries com IL-6 i IL-23,

que potencien la diferenciació de la subpoblació de cèl·lules Th17. Pel contrari, nivells baixos d'AMPc promouen la síntesis de citocines tipus IL-12 (que promou el desenvolupament de les Th1) i IL-27 (que potencia la diferenciació de les Tregs) (Hansen and Caspi 2010) (**Figura 9**).



**Figura 9. AMPc i cèl·lules dendrítiques.** La transcripció d'IL-6 i IL-23 s'indueix per la producció d'AMPc, que activa la via de la PKA, i que porta a l'expressió gènica d'aquestes citocines. IL-6 i IL-23, juntament amb TGF- $\beta$  i IL-1, indueixen el factor de transcripció ROR- $\gamma$ t a les cèl·lules T, activant la producció de citocines Th17-específiques. IL-6 suprimeix directament l'expressió del factor de transcripció FoxP3, que estableix el fenotip de les Tregs. La disminució dels nivells d'AMPc inhibeix l'expressió d'IL-6 i IL-23. En la seva absència, FoxP3 es regula a l'alça activant la cèl·lula T en presència de TGF- $\beta$  i bloqueja la diferenciació a Th17 per inhibició directa de ROR- $\gamma$ t. La resposta Th1 no s'afecta per aquest procés. Modificat de (Hansen and Caspi 2010).

## 6.LA RESPOSTA NEUROIMMUNE

Durant els últims anys hi ha hagut un interès creixent en l'estudi de les interaccions entre el sistema nerviós i el sistema immune durant el desenvolupament, la homeòstasis i la resposta a danys, el que anomenem Neuroimmunologia. La majoria d'interaccions impliquen tant SNC com sistema immune incloent: funcions fisiològiques d'ambdós sistemes en condicions basals o malalties; el mal funcionament d'un o ambdós sistemes que pot portar al desenvolupament de patologies; i els factors físics, químics i ambientals que afecten els dos sistemes al llarg de la vida.

Malgrat l'estat d'immunoprivilegi que s'ha guanyat el SNC degut a la seva incapacitat per desenvolupar una resposta immune i processar antígens, existeix una comunicació bidireccional entre aquests i el sistema immune. Encara que aquest immunoprivilegi sigui parcialment veritat, el SNC mostra una reacció immune innata molt ben organitzada en resposta a infeccions sistèmiques i al dany cerebral (Rivest 2003).

Les cèl·lules immunes i les molècules neurimmunes com les citocines, les quimiocines i els factors de creixement són capaces de modular la funció cerebral a través de diverses vies de senyalització. Factors d'estrés immunològics, fisiològics i psicològics fan que citocines i altres molècules del sistema immune actuïn com a mediadors de les interaccions amb els sistema neuroendocrí, neuropeptídic i neurotransmissor.

La via de comunicació entre cervell i sistema immune produeix una sèrie de senyals que activen les cèl·lules gials del SNC produint l'alliberació de citocines proinflamatòries.

La neuroinflamació i l'activació de la resposta neuroimmune tenen un paper molt important en l'etiologia d'una gran varietat de patologies neurològiques com l'íctus, el Parkinson, l'Alzheimer, l'Esclerosis Múltiple, el dolor o la demència associada a SIDA. No obstant, citocines i quimiocines també poden exercir les seves funcions moduladores en condicions basals.

El sistema nerviós es troba sota la monitorització constant tant dels sistema immune innat com de l'adaptatiu. Però la desregulació de la seva resposta, el mal funcionament dels mecanismes de comunicació entre sistema immune innat i adaptatiu, i les alteracions en els mecanismes de desenvolupament de la resposta immune innata poden predisposar al SNC a autoimmunitat i neurodegeneració (Hauser and Oksenberg 2006). L'Esclerosis Múltiple és un clar exemple d'aquest desordre neuroimmunològic.

## 7. ESCLEROSIS MÚLTIPLE I EAE

### 7.1. ESCLEROSIS MÚLTIPLE

L'Esclerosis Múltiple (EM) és una de les malalties neurològiques més comuns en adults joves a Europa i Amèrica del Nord (Noseworthy et al. 2000). A nivell mundial, al voltant d'un milió de persones es veuen afectades per aquesta malaltia inflamatòria crònica del SNC.

Els símptomes de l'EM són deguts a la disrupció de les baines de mielina dels axons del SNC degut a un atac per part del sistema immune. Aquests símptomes inclouen des de debilitat d'alguna de les extremitats fins a paràlisis, atàxia i dèficits cognitius, i portaran finalment a la mort del pacient.

L'EM es diagnostica per Ressonància Magnètica, revelant d'aquesta manera múltiples lesions o plaques que es distribueixen a través de la substància blanca de cervell i medul·la espinal. Les plaques es poden classificar en actives, cròniques actives o inactives. Els anàlisis histològics de les plaques actives revelen infiltració de cèl·lules T, macròfags i cèl·lules B, desmielinització, dany axonal i reactivitat astrocítica i microglial (Lassmann et al. 2001). A nivell histològic, Lassmann i col·laboradors classifiquen les lesions en 4 subtipus, segons si presenten: (I) desmielinització per macròfags, (II) desmielinització per anticossos, (III) oligodendropatia distal, o (IV) desmielinització secundària al dany oligodendrocític.

Es creu que aquests canvis inflamatoris es deuen a una resposta de tipus autoimmune contra components de la mielina. Però altres possibilitats inclouen el fet que aquesta reacció inflamatòria vagi dirigida en primera instància contra un agent infecció no conegut (Kakalacheva et al. 2011); o que la resposta inflamatòria sigui secundària a un procés neurodegeneratiu.

Tot i que les seves causes són desconegudes, diversos estudis es centren en la cerca de modificacions genètiques que augmentin el risc a desenvolupar EM (Oksenberg and Baranzini 2010), en els possibles factors ambientals desencadenants de la malaltia (Lauer 2010) i en la interacció gens-ambient (Giovannoni and Ebers 2007).

Els coneixements actuals sobre l'EM com a malaltia autoimmune es basen en estudis directes de les lesions de pacients amb aquesta patologia i de models animals que presenten desmielinització de tipus inflamatori. Entre aquests cal destacar



l'Encefalomièlitis Autoimmune Experimental o EAE, l'ús de la qual ha permès profunditzar en els mecanismes immunològics de la malaltia (Steinman 2003).

### 7.2. LA RESPOSTA IMMUNE EN EL MODEL ANIMAL D'EAE

El model animal d'Esclerosis Múltiple més àmpliament utilitzat és l'encefalomièlitis autoimmune experimental (EAE) (Zamvil and Steinman 1990; Gold et al. 2006). L'EAE pot ser induïda mitjançant la immunització de soques susceptibles d'animals d'experimentació, tant en primats com en rosegadors, amb autoantígens de mielina emulsionats en adjuvant de Freund complet (CFA). Una setmana després de la immunització, cèl·lules T CD4<sup>+</sup> autorreactives específicament contra l'antigen de mielina s'activen i "expand" en els òrgans limfoides perifèrics (Wekerle et al. 1994). Deu dies després de la immunització, les cèl·lules T activades comencen a travessar la barrera hematoencefàlica (BHE) de forma massiva; pel contrari, les cèl·lules T inactives no són capaces de travessar-la (Flugel et al. 2001). Les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> autorreactives contra l'antigen de mielina són reactivades a l'espai perivascular mitjançant el complex major d'histocompatibilitat (MHC) de tipus II (Kawakami et al. 2005). Aquí, els antígens de mielina són bàsicament presentats a les cèl·lules T que infiltren per les cèl·lules presentadores d'antigen (APCs) perivasculars i no per les APCs locals del SNC, la micròglia (Greter et al. 2005). Aquest fet provoca una major activació de les cèl·lules T i la producció de citocines com interleucina (IL)-17, interferó (IFN)- $\gamma$ , IL-6, i factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ , així com de quimiocines, en el SNC. Seguidament, cèl·lules del sistema immune com granulòcits i macròfags són atretes al parènquima del SNC, provocant inflamació tissular i desmielinització. La secreció de molècules com l'òxid nítric (NO) i el TNF, i la degradació de la mielina són conseqüència d'aquesta resposta (Probert et al. 2000; Willenborg et al. 2007). De manera similar que en l'EM, els episodis inflamatoris en EAE disminueixen de forma espontània i els animals es recuperen parcialment, suggerint que la inflamació mitjançant cèl·lules T en el SNC està regulada fins i tot en absència de teràpia. Depenent de la soca de ratolí utilitzada i l'autoantigen emprat per la immunització, es poden produir episodis de recaiguda i recuperació (McRae et al. 1992; Gold et al. 2000).

Degut a que el model EAE comparteix moltes característiques clíniques i histopatològiques amb l'EM, es creu que l'EM és una malaltia autoimmune causada per cèl·lules T MHC tipus II específiques contra antigen de mielina (Sospedra and Martin 2005). No obstant, una de les crítiques principals sobre el model recau en el fet que el

model d'EAE és un model d'autoimmunitat induïda, mentre que l'EM es desenvolupa de forma espontània en humans. A més, en el model animal d'EAE no es produeix desmielinització per anticossos ni immunopatologia causada per cèl·lules T CD8<sup>+</sup>, processos que es creuen importants en la malaltia en humans.

Però a part d'ajudar en el coneixement de les característiques clinicopatològiques de l'EM, el model EAE ha estat extremadament útil per entendre la biologia de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> autorreactives *in vivo*. Després de ser activades, les cèl·lules T naïf es diferencien en diferents subpoblacions de cèl·lules T efectores, que anomenem Th, produint diverses citocines i realitzant diferents funcions efectores. En un inici, es creia que les cèl·lules Th podien adquirir tant un fenotip productor de IFN- $\gamma$ , Th1, com un fenotip productor d'IL-4, Th2 (Mosmann and Coffman 1989). Aquest paradigma ha canviat després del descobriment d'una tercera subpoblació de cèl·lules Th que produeixen IL-17 i presenten característiques efectores diferents (Korn et al. 2007). En els últims anys s'han publicat diversos estudis sobre aquesta subpoblació de cèl·lules T: s'han identificat les citocines responsables de la seva diferenciació, els factors de transcripció claus per la seva generació, i s'han establert les seves funcions en la resposta inflamatòria i l'autoimmunitat. Encara que primer es pensava que les cèl·lules Th1 eren les úniques considerades patogèniques en EAE, s'ha demostrat que les Th17 són encara més potents a l'hora de provocar una resposta inflamatòria en aquest model animal. A part de les cèl·lules T efectores, el compartiment cel·lular T CD4<sup>+</sup> perifèriques el conformen una altra subpoblació de cèl·lules T reguladores (T-regs) que modulen la resposta de les Th i han demostrat un efecte supressor en el desenvolupament d'EAE. La identificació de Foxp3 com el principal factor de transcripció en la generació de les T-regs, ha permès definir amb exactitud les poblacions de T-reg (Schubert et al. 2001), permetent l'estudi de la seva interacció amb les cèl·lules Th patogèniques i el seu paper en la regulació de la resposta inflamatòria autoimmune.

## 7.2.1. IMMUNITAT ADAPTATIVA

### 7.2.1.1. Cèl·lules Th1

Encara que l'especificitat contra l'antigen de mielina és crucial per la capacitat encefalitogènica d'un clon de cèl·lula T, altres factors com l'alliberació d'uns tipus específics de citocines i l'expressió de certes molècules d'adhesió pel tràfic de cèl·lules T són també essencials.

La resposta descontrolada de Th1 resulta en autoimmunitat específica de teixit. De fet, les cèl·lules Th1 amb especificitat contra antígens de mielina propis poden produir el desenvolupament d'EAE en ser transferides en animals no immunitzats prèviament, el que s'anomena transferència adoptiva d'EAE (Kuchroo et al., 1993). La diferenciació de les cèl·lules Th1 és dependent de IFN- $\gamma$ , secretat en primera instància per les cèl·lules del sistema immune innat. Llavors el fenotip Th1 s'estabilitza per l'acció d'IL-12, citocina secretada per les APCs activades. Un cop s'ha unit al seu receptor, IFN- $\gamma$  indueix la transcripció del factor T-bet en les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> naïf. T-bet és un potent transactivador del gen d' IFN- $\gamma$  i també indueix l'expressió del receptor d'IL-12 per tal que les Th1 puguin respondre a aquesta citocina. D'aquesta manera IL-12 estabilitza el fenotip de Th1 induint també l'expressió d' IFN- $\gamma$  (Glimcher 2001).

Les cèl·lules Th1 també expressen un perfil de receptors de quimiocines diferents de les cèl·lules Th2, que les dirigiran cap a òrgans específics segons la producció de diverses quimiocines. Les Th1 provoquen una cascada de mecanismes efectors un cop són al lloc de la inflamació. Primer de tot, l' IFN- $\gamma$  indueix l'expressió de molècules MHC de tipus I i II en cèl·lules epitelials i APCs. Seguidament, les Th1 produeixen una sèrie de quimiocines que atrauran a cèl·lules mononuclears i faran que els infiltrats siguin majoritàriament macròfags. Els macròfags són les principals cèl·lules que infiltren en les lesions d'EAE i EM i són importants cèl·lules efectores en el procés de desmielinització; els macròfags activats produeixen TNF- $\alpha$  i NO i fagociten de forma activa la mielina en un procés anomenat citotoxicitat dependent d'anticòs produïda per cèl·lules. Per tant, l'autoimmunitat mitjançant la resposta Th1 pot explicar molts dels aspectes clínics i histopatològics presents en l'EM.

### 7.2.1.2. Cèl·lules Th17

El concepte de resposta autoimmunitària per Th1 va canviar amb el descobriment d'una nova subpoblació de cèl·lules Th efectores que presentaven un perfil diferent en la producció de citocines i en els seus mecanismes efectors, les Th17.

Es va observar la presència d'una subpoblació de Th que produïen IL-17 i no IFN- $\gamma$  com a resposta a IL-23 (Langrish et al. 2005). Degut a la producció de la citocina IL-17, a aquesta subpoblació se l'anomenà cèl·lules Th17. En estudis posteriors, es va poder observar clarament que l'absència d'algun component de l'eix IL-23/Th17 protegia o atenuava de forma considerable el desenvolupament de l'EAE. A més, IL-17 es va trobar

elevada en les lesions de moltes malalties autoimmunes, incloent l'EM (Lock et al. 2002). Tots aquests resultats suggerien un paper important d'IL-17 i de les cèl·lules Th17 en la inducció de la resposta inflamatòria i autoimmune.

Algunes de les citocines de la família IL-17 tenen propietats proinflamatòries, induint la producció d'IL-6, IL-1 $\beta$ , i TNF- $\alpha$ , així com quimiocines i metaloproteinases en els teixits afectats. Ja que els receptors per la família IL-17 no s'expressen tan sols en cèl·lules hematopoètiques, sinó també en cèl·lules epitelials i endotelials, les citocines IL-17 produeixen un ampli espectre de respostes tissulars.

Com s'ha comentat anteriorment, IL-23 manté o estimula l'expansió de les cèl·lules Th17 de memòria tant *in vitro* com *in vivo*, però no és el factor de diferenciació per aquestes cèl·lules, ja que les cèl·lules T naïf no expressen el receptor per aquesta citocina. De fet, diversos grups van observar que la combinació de TGF- $\beta$  i IL-6 produïa la diferenciació a cèl·lules T productores d'IL-17 de les cèl·lules T naïf i que, a més, induïa l'expressió del receptor d'IL-23 en aquestes cèl·lules (Bettelli et al. 2006; Mangan et al. 2006; Veldhoen et al. 2006). Fou una gran sorpresa descobrir que TGF- $\beta$ , considerada una citocina amb efectes immunosupressors (Li et al. 2006), fos necessària, juntament amb IL-6, per la inducció de les Th17. En realitat, TGF- $\beta$  sol, es capaç d'induir la generació de Tregs Foxp3<sup>+</sup> i inhibir la proliferació de les cèl·lules T naïf. Però paradoxalment, TGF- $\beta$  és actualment considerat part del còctel de diferenciació d'una subpoblació de cèl·lules Th amb alta capacitat proinflamatòria. En base a això, es va proposar una relació recíproca entre Tregs i Th17, on IL-6 tenia un paper essencial en modular el balanç entre aquests dos tipus cel·lulars (Bettelli et al. 2006; Korn et al. 2007) regulant l'inici de la resposta autoimmune en vers la tolerància.

Mentre IL-6 sembla ser produït per cèl·lules de sistema immune innat després de ser activades per agents microbians mitjançant receptors com els receptors tipus Toll (TLRs), TGF- $\beta$  sembla ser secretat per cèl·lules T naïf, Tregs i també DCs. Un cop TGF- $\beta$  i IL-6 han produït la diferenciació a Th17, la citocina IL-23 sembla indispensable per iniciar la resposta inflamatòria tissular de les cèl·lules Th17 (Zhou et al. 2007), suggerint que aquesta citocina podria conferir patogenicitat a les Th17.

Actualment, no està clar si les cèl·lules Th17 i les Th1 han de cooperar per tal d'induir la resposta inflamatòria autoimmune en SNC que s'observa en els animals EAE. És possible que les Th17, degut a la seva capacitat d'infiltració, representin la primera onada de

cèl·lules Th efectores i preparin el terreny per la posterior infiltració d'altres cèl·lules T efectores. Una altra hipòtesis és que les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> que produeixen tant IFN- $\gamma$  com IL-17 esdevinguin cèl·lules productores tan sols d'una de les citocines, canviant així les freqüències d'ambdues poblacions durant el transcurs de la malaltia.

Pel que fa als estudis en humans, cèl·lules T IL17<sup>+</sup> s'han detectat en lesions actives i actives cròniques de pacients amb EM (Lock et al. 2002; Tzartos et al. 2008), i molècules relacionades amb l'eix IL-23/Th17 s'han trobat associades a inflamació crònica del SNC en malalts d'EM (Illes et al. 2008). A més, les cèl·lules Th17 han estat identificades en humans, on, de forma similar al ratolí, expressen nivells elevats de receptors d'IL-23. Contràriament, s'ha demostrat que TGF- $\beta$  juntament amb IL-6 no són capaces d'induir la producció d'IL-17 en cèl·lules T naïf d'humans, i s'ha suggerit que tant IL-1 $\beta$  i IL-6 o IL-1 $\beta$  i IL-23 serien els factors de diferenciació de les Th17 humanes (Acosta-Rodriguez et al. 2007; Wilson et al. 2007). També s'ha pogut demostrar el paper de TGF- $\beta$  en la diferenciació de les cèl·lules Th17 humanes. IL-21 i IL-6, juntament amb TGF- $\beta$ , poden induir la diferenciació a Th17 de les cèl·lules T naïf (Manel et al. 2008; Volpe et al. 2008). Per altra banda, s'ha observat que TGF- $\beta$  inhibeix l'expansió de les Th17 del compartiment de cèl·lules T de memòria (Acosta-Rodriguez et al. 2007).

### 7.2.1.3. Cèl·lules T-regs

Aquesta subpoblació immunosupressora de cèl·lules T CD4<sup>+</sup>, les T-regs, es caracteritza per l'expressió de CD25 i el Foxp3, pel que també s'anomenen CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-regs o Foxp3<sup>+</sup> T-regs. Foxp3 és un factor de transcripció que estabilitza el fenotip funcional d'aquestes cèl·lules (Gavin et al. 2007). L'eliminació de les CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-regs abans de la immunització augmenta la severitat de l'EAE i fa que les soques resistents a la malaltia siguin susceptibles (Reddy et al. 2004). A més, la transferència adoptiva d'aquestes cèl·lules abans de l'inici de la malaltia atenua l'EAE (Hori et al. 2002).

Mentre que la ràtio entre les cèl·lules T efectores específiques d'antigen i les T-regs està a favor de les efectores al pic de la malaltia, això canvia durant la remissió, on hi ha una disminució massiva del nombre de cèl·lules T efectores i un manteniment del número de T-regs en el SNC. Aquesta ràtio no és l'únic paràmetre a tenir en compte durant la regulació de la resposta autoimmune, ja que altres factors com la presència d'IL-6 i TNF- $\alpha$  al lloc de la inflamació s'ha demostrat que impossibiliten la supressió de les Th efectores per part les T-regs, fent-les resistents a aquesta immunomodulació (Korn et al. 2007). Això

podria explicar perquè malgrat la presència de T-regs en els llocs d'inflamació, la immunopatologia no pot ésser controlada de forma eficient, com s'ha pogut observar en pacients d'EM i altres malalties autoimmunes.

## 7.2.2. IMMUNITAT INNATA

### 7.2.2.1. Receptors Toll-like (TLRs)

Per tal d'induir l'EAE, els autoantígens de mielina s'han d'emulsionar amb un adjuvant com l'adjuvant complet de Freund (CFA), que conté *Mycobacterium tuberculosis*, i es necessiten injeccions addicionals de toxina pertússica. El descobriment que certes molècules bacterianes podien desencadenar la resposta immune innata i una subseqüent resposta immune adaptativa contra un antigen va centrar l'atenció en el paper de l'adjuvant durant l'activació de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> en el model EAE.

Els TLRs es troben principalment en DCs, macròfags/micròglia i mastòcits. Aquests receptors no reconeixen antigens específics com fan les cèl·lules T o els anticossos, sinó que s'uneixen al que anomenem patrons moleculars associats a patògens o PAMPs, que poden ser lípids, lipopèptids, proteïnes o àcids nucleics, i que s'expressen normalment en els microbis (Akira and Hemmi 2003).

Els TLRs senyalitzen a través de la proteïna adaptadora MyD88. Els receptors TLR3 i TLR4 són les excepcions: TLR3 senyalitza a través de la via MyD88-independent; TLR4 senyalitza a través d'ambdues vies. En mamífers, MyD88 controla l'activació induïda per CFA de les DC mieloides i dirigeix la polarització en vers una resposta immune de tipus Th1 (Schnare et al. 2001). De fet, els ratolins MyD88<sup>-/-</sup> són resistents a EAE, i s'ha demostrat que MyD88 és necessari per l'expressió de citocines proinflamàtòries com IL-6 i IL-23p40 en DCs esplèniques, i per la diferenciació de les cèl·lules Th17 (Prinz et al. 2006; Marta et al. 2008).

Els TLRs també s'expressen en cèl·lules del SNC i poden influenciar en la resposta immune local. S'ha observat un augment de l'expressió de TLRs en lesions cerebrals de pacients amb EM i en cèl·lules mononuclears del LCR, així com en lesions cerebrals d'animals amb EAE (Bsibsi et al. 2002; Andersson et al. 2008). La micròglia duu a terme diversos programes específics d'activació segons els diferents senyals dels TLRs i conforma un enllaç entre les respostes immunes innata i adaptativa, on les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> són activades i proliferen (Jack et al. 2007). Per tant, els senyals dels TLRs són uns potents moduladors de l'activació microglial.

### 7.2.2.2. Cèl·lules Densrítiques (DCs)

L'acumulació de DCs al SNC (Matyszak and Perry 1996; Fischer and Reichmann 2001) és força abundant, malgrat el caràcter d'immunoprivilegi del SNC, i és degut a que aquest té les seves pròpies APCs residents (micròglia i astròcits). Per tant, en un inici fou de vital importància el fet de determinar l'origen d'aquestes DCs – si derivaven de precursors glicals o provenien d'infiltrats perifèrics. Es va poder determinar que en un context de neuroinflamació, les DCs CD11c<sup>+</sup> derivaven principalment de precursors de la medul·la òssia (Bailey et al. 2007; Deshpande et al. 2007).

Estudis en models animals d'EM han demostrat que les DCs es localitzen a l'interior dels focus d'inflamació de les lesions (Serafini et al. 2000; Fischer and Reichmann 2001). També s'ha pogut observar la presència d'aquestes cèl·lules en pacients amb EM, tant a les meninges com en les lesions del parènquima cerebral (Serafini et al. 2006).

S'ha pogut demostrar que l'EAE pot ser induïda tan sols amb la transferència adoptiva de DCs que presentin l'antigen MOG<sub>35-55</sub> en animals receptors naïf (Weir et al. 2002), mostrant el paper clau d'aquestes cèl·lules en la resposta neuroinflamatòria. A més, s'ha observat una correlació entre el número de DCs i la severitat de la malaltia (Whartenby et al. 2005). Això, juntament amb el fet que són l'únic tipus cel·lular clau per la inducció de la malaltia, subratllen la importància de les DCs en la patologia autoimmune del SNC.

Un altre paper clau d'aquestes cèl·lules resideix en el fet que no són tan sols capaces d'activar les cèl·lules T naïf, sinó que polaritzen la seva diferenciació cap a un fenotip Th17. Això ho duen a terme mitjançant la creació d'un ambient de citocines adequat, mitjançant la secreció de TGF- $\beta$ , IL-6 i IL-23 (Bailey et al. 2007; Deshpande et al. 2007).

### 7.2.2.3. Macròfags / Micròglia

Els macròfags perivasculars són un tipus cel·lular important en el SNC. Es troben localitzats en els vasos sanguinis cerebrals, entre les membranes basals endotelial i glial, una situació estratègica per trobar-se amb els patògens i assistir en el control de les respostes immunes adaptativa i innata en el SNC (Fabriek et al. 2005). Els macròfags s'activen en entrar en contacte amb el patogen o antígen, però també mitjançant citocines tipus Th1, com IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ . En animals EAE, la supressió d'aquestes cèl·lules elimina la simptomatologia clínica de la malaltia, però no hi ha canvis en el nombre de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> infiltrades, suggerint que els macròfags no tenen un paper clau en el procés d'infiltració de les cèl·lules T en el SNC (Tran et al. 1998).



La micròglia són els macròfags residents del SNC que provenen de precursors de la medul·la òssia. En condicions inactives, la micròglia pot sobreviure al microambient del SNC, suggerint que aquestes cèl·lules són clau en el manteniment de l'homeòstasi (Nimmerjahn et al. 2005). No obstant, en resposta a un estímul inflamatori, la micròglia s'activa, augmenta l'expressió de CD45, MHC i molècules co-estimuladores, la capacitat fagocítica, i és capaç d'estimular la proliferació de les subpoblacions Th1 i Th2 (Aloisi 2001).

S'ha demostrat que aquestes poblacions cel·lulars tenen diverses funcions en el model d'EAE: actuen com a APCs, promouen dany tissular mitjançant la secreció de diverses citocines proinflamatòries, quimiocines, metaloproteinases, glutamat i òxid nítric, i s'encarreguen de fagocitar els *debris* de mielina.

Igual que els macròfags, la micròglia expressa una sèrie de receptors de superfície capaços de reconèixer els patògens (com els TLRs), i que els activen per tal d'amplificar la resposta inflamatòria del SNC (Aloisi 2001). D'aquesta manera, la micròglia actua com una primera línia de defensa al SNC, mitjançant l'inici d'una potent resposta proinflamatòria contra els agents patògens (Carpentier et al. 2008).

Pel que fa al seu paper com a APCs, s'ha observat en el model d'EAE, una sobreexpressió de les molècules MHC de classe II en aquestes cèl·lules. Els macròfags i la micròglia fagociten la mielina, processen l'antigen i el presenten a les cèl·lules T. Sembla que l'expressió d'MHC II en la micròglia afavoreix la remissió de la simptomatologia mitjançant l'activació de les T-regs, mentre que la seva expressió en els macròfags perivasculars promou l'EAE gràcies a l'activació de subpoblacions de cèl·lules Th (Hickey and Kimura 1988; Almolda et al. 2010). Els macròfags i la micròglia són capaces de presentar l'antigen a les cèl·lules T de forma més eficient que d'altres cèl·lules glials com els astròcits, però no tant eficientment com les DCs.

A part de la funció com a presentadores d'antigen, els macròfags/micròglia són capaços de secretar una abundant quantitat de molècules efectores, tant citocines proinflamatòries (IFN- $\gamma$ , IL-6 i TNF- $\alpha$ ), com antiinflamatòries (IL-10 i TGF- $\beta$ ) (Raivich and Banati 2004). A més, són capaces de respondre de forma força eficient a l'estimulació per IL-17, tot i expressar nivells baixos del receptor per aquesta citocina. També secreten un ampli espectre de quimiocines, molt importants per al reclutament i la infiltració de leucòcits en el SNC. Estudis en animals *knockout* per alguna d'aquestes molècules mostren una reducció en la severitat de l'EAE, així com una aparició tardana de la simptomatologia i



nivells disminuïts de DCs i macròfags en la medul·la espinal d'aquests ratolins (Dogan et al. 2008). A més de la secreció de citocines i quimiocines, els macròfags/micròglia produeixen radicals lliures com l'òxid nítric (NO) durant el transcurs de l'EAE. Aquestes cèl·lules expressen de forma constitutiva la sintasa d'òxid nítric induïble (iNOS), que és l'encarregada de generar l'NO (Kim et al. 2000). Una altra de les molècules efectores que poden produir aquestes cèl·lules en grans quantitats és el glutamat, el principal neurotransmissor excitador del SNC. De forma general, nivells elevats de glutamat extracel·lular són tòxics per neurones i oligodendròcits, un fenomen que s'anomena excitotoxicitat glutamatèrgica. En el model d'EAE, la producció de glutamat per part de macròfags i micròglia s'ha pogut correlacionar amb el dany axonal. De fet, si es bloqueja el receptor AMPA/kainat (un receptor de glutamat), el curs de la malaltia s'alenteix, i es produeix una reducció de la desmielinització i del dany axonal (Fallarino et al. 2010).

Cal destacar també l'important paper de la micròglia en la patologia de l'EAE. Estudis en ratolins transgènics als quals se'ls ha eliminat la micròglia han demostrat que aquest fet produeix, durant l'EAE, una reducció en el dia d'inici de la malaltia, la progressió i la desmielinització (Heppner et al. 2005), mostrant la importància d'aquestes cèl·lules en la severitat de l'EAE.

Per tant, podem dir que macròfags i micròglia duen a terme un ampli espectre de funcions efectores essencials pel control de la resposta de les cèl·lules T que contribueixen d'alguna manera en l'inici i la progressió de l'EM i el seu model animal, l'EAE.

#### 7.2.2.4. Astròcits

Els astròcits també poden ser considerats com a APCs residents del SNC. Encara que el seu paper en la neuroimmunologia es creu més regulador, existeixen evidències sobre la seva contribució i capacitat per presentar antígens i activar les cèl·lules T.

Durant l'EAE, les cèl·lules T naïf entren en contacte per primer cop amb l'antigen de mielina en la perifèria, però necessiten ser reactivades un cop han entrat al SNC. És possible que els astròcits siguin en part responsables d'aquesta reactivació de les cèl·lules T específiques de mielina. Diversos estudis han pogut demostrar que els astròcits estimulats amb IFN- $\gamma$  són capaços d'induir la diferenciació i la proliferació d'aquesta subpoblació de cèl·lules T (Carpentier et al. 2005; Constantinescu et al. 2005). De fet, els astròcits murins expressen nivells baixos de MHC de classe II que es regulen a l'alça després de l'estimulació amb IFN- $\gamma$ .

De forma similar a les APCs, els astròcits reaccionen al dany tissular. Són capaços de modificar la resposta en els altres tipus cel·lulars del SNC mitjançant la producció de citocines, convertint-los en potents reguladors de la resposta neuroimmunitària. Els astròcits poden tant potenciar com inhibir l'activació de la micròglia. En l'EAE i l'EM, els astròcits produeixen molècules immunosupressores com TGF- $\beta$  i IL-10. El TGF- $\beta$  pot actuar en la micròglia induint la inhibició de l'expressió de l'MHC de classe II i de l'activació microglial (Aloisi et al. 2000). Els astròcits també poden actuar contenint la inflamació mitjançant la formació d'una barrera física que s'anomena cicatriu glial, caracteritzada per canvis morfològics i d'expressió gènica induïts per la resposta inflamatòria (Voskuhl et al. 2009). Per tant, sembla que els astròcits en aquest cas tindrien un paper important en la regulació de la resposta immune atenuant la neuroinflamació.

Tant si els astròcits poden o no presentar l'antigen a les cèl·lules T durant l'EM, poden generar un ambient que promogui l'activació d'aquestes cèl·lules. Els astròcits poden secretar IL-12 (activa Th1), IL-4 (Th2), IL-23 (Th17), IL-6 i TGF- $\beta$  (Th17), cadascuna de les quals pot potenciar la diferenciació de les cèl·lules T naïf en un subtipus diferent de cèl·lules Th en presència d'antigen (Constantinescu et al. 2005). També tenen un paper important en el reclutament de cèl·lules T al SNC. Els astròcits produeixen quimiocines que exerceixen aquesta funció en diverses fases del model EAE. Curiosament, TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  estimulen als astròcits a secretar quimiocines que atrauen DCs immadures. Per tant, els astròcits poden reclutar APCs més eficients en un ambient ple de *debris* de mielina al mateix temps que les cèl·lules T específiques de mielina necessiten ser reactivades, potenciant d'aquesta manera el desenvolupament de la malaltia (Ambrosini et al. 2005).

En conclusió, el sistema immune innat pot exercir efectes tant beneficiosos com perjudicials durant el transcurs de l'EAE i l'EM. Les cèl·lules del sistema immune innat cooperen amb les del sistema immune adaptatiu per assegurar-se un bon funcionament en la resposta. Però el mal funcionament del sistema immune innat pot portar a accions potencialment patogèniques del sistema immune adaptatiu, a més de provocar dany tissular per ell mateix. Les APCs en el SNC són clau per la defensa envers els patògens, però poden produir una resposta inflamatòria mantinguda en el temps que pot ser perjudicial pels oligodendròcits i la mielina. Els macròfags/micròglia regulen a l'alça les proteïnes típiques de la maquinària de presentació antigènica, així com la secreció de citocines inflamatòries com TNF- $\alpha$ . Les DCs, tot i no ser cèl·lules residents del SNC, han sorgit com a cèl·lules clau en l'activació de les cèl·lules T autorreactives tant a la perifèria

## *Introducció*

com en el SNC. A més, sembla que tinguin una participació directa en la resposta inflamatòria tipus Th17. I finalment els astròcits, que són el tipus cel·lular més nombrós del SNC i són crucials pel manteniment de la integritat de la BHE. No obstant, poden produir dany mitjançant la secreció de quimiocines que reclutaran infiltrats cel·lulars del sistema immune que poden atacar els oligodendròcits i la seva mielina.

***Objectius***

## Objectius

La regulació dels nivells intracel·lulars d'AMPc és un mecanisme important en el control de diversos processos fisiològics, entre ells el de la resposta neuroimmune. En aquesta modulació, les fosfodiesterases (PDEs) tenen un paper molt important. L'objectiu principal d'aquesta tesi va ser estudiar l'expressió de les PDEs específiques d'AMPc, concretament les de la família PDE4, en el SNC en relació amb la resposta inflamatòria en el model murí d'Esclerosis Múltiple, l'Encefalomièlitis Autoimmune Experimental (EAE). Per aquest motiu es van plantejar els següents objectius específics:

1. Estudi del model animal d'EAE en ratolins *wildtype*. Avaluació simptomatològica, histopatològica i de la resposta neuroimmune en aquests animals.
2. Canvis en l'expressió de l'ARNm de les PDE de la família 4 en el model EAE en ratolins *wildtype*.
3. Canvis en l'expressió de la proteïna PDE4B en SNC en el model EAE en ratolins *wildtype*.
4. Identificació dels tipus cel·lulars en SNC que sobreexpressen l'isoforma PDE4B en el model EAE en ratolins *wildtype*.
5. Estudi del model EAE en ratolins *knockout* per a PDE4A i PDE4B. Avaluació simptomatològica, histopatològica i de la resposta neuroimmune en aquests animals.

***Materials i Mètodes***

## 1. OBTENCIÓ DELS TEIXITS

Els treballs presentats en aquesta tesi es van realitzar amb cervells i medul·les espinals de ratolins de la soca C57BL6.

En tot moment els animals van ser manipulats seguint la legislació espanyola vigent sobre protecció d'animals d'ús en experimentació i altres propòsits científics, d'acord amb les normes de la Unió Europea de benestar animal (O.J. of E.C. L358/1 18/12/1986), la normativa sobre l'ús d'animals de laboratori de la Unió Europea (86/609/EU) i seguint els procediments aprovats pel Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya.

Es va intentar minimitzar al màxim el nombre d'animals utilitzats i el seu patiment durant els processos experimentals. Els ratolins es van estabular sota cicles de 12 hores de llum/fosc, en una temperatura ambiental constant, amb lliure mobilitat, i aigua i menjar *ad libitum*.

### 1.1. MODELS ANIMALS UTILITZATS

#### 1.1.1. MODEL D'ENCEFALITIS AUTOIMMUNE EXPERIMENTAL (EAE)

El model es realitzà en ratolins femella C57BL6 (15-20gr) de 6 setmanes d'edat (Charles River Laboratories, França).

L'EAE va ser induïda mitjançant una immunització subcutània amb 100µg de pèptid sintètic de glicoproteïna oligodendrocítica de mielina (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*, MOG), dels aminoàcids 35 al 55 (MOG<sub>35-55</sub>) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanya), barrejat amb 100µl d'adjuvant de Freund incomplet (Sigma-Aldrich) complementat amb 500µg de *Mycobacterium tuberculosis* (soca H37Ra, Difco, Detroit, MI, EUA). 200ng de toxina pertússica es van injectar via intraperitoneal els dies 0 i 2 post-immunització. Els animals control es van realitzar mitjançant immunització subcutània amb adjuvant de Freund incomplet complementat amb *M. tuberculosis* i sense pèptid de MOG<sub>35-55</sub>, o bé amb salí. Els ratolins van ser pesats i examinats diàriament per la detecció de signes neurològics utilitzant la següent escala: 0 = sense símptomes clínics; 1 = pèrdua del to muscular de la cua; 2 = debilitat muscular d'una o ambdues potes del darrera; 3 = paraparesis d'una de les potes del darrera; 4 = paràlisi dels membres posteriors; i 5 = estat moribund amb poc moviment i problemes respiratoris (McFarlin et al. 1974). Els animals van ser sacrificats els dies 10, 15, 21 i 30 postimmunització.

## 1.2. PREPARACIÓ DEL TEIXIT

Els ratolins van sacrificar-se per dislocació cervical o sobredosis d'isoflurà, es van extreure de forma immediata el cervell i la medul·la espinal, es van submergir en solució salina (NaCl 0,9%) a 4°C, i es van congelar ràpidament en neu carbònica i foren guardats a -20°C fins a la seva utilització.

Els teixits congelats van ser tallats en seccions coronals de 14µm de gruix mitjançant un micròtom-criòstat (Microm HM500 OM) en portaobjectes pretractats amb APTS (3-aminopropyltriethoxysilane, Sigma-Aldrich) i es van mantenir a -20°C fins al moment de ser processats.

La regió cervical de la medul·la espinal va ser dissecada per tal de procedir a l'extracció de l'ARN.

Per als cultius primaris de leucòcits, la melsa d'aquests ratolins es va extreure en condicions estèrils. Es va homogeneïtzar de forma manual en medi de cultiu RPMI-5 (RPMI 1640, 5% fetal bovine serum o FBS, 2 mM L-glutamina, 50 µM 2-mercaptoetanol, 100 unitats/ml penicil·lina i 100 µg/ml estreptomina sulfat) en plaques de petri. Es van passar les cèl·lules per un filtre de niló de 200 µm per tal de disgregar-les. Les cèl·lules es van incubar durant 5min a temperatura ambient amb solució de lisis ACK (0.15 M NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 0.1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7.2-7.4) per eliminar selectivament els eritròcits. Es van cultivar les cèl·lules restants (leucòcits) en una placa de 96 pous, 5x 10<sup>5</sup> cèl·lules/pou, en RPMI-10 (igual que l'anterior, però amb 10% FBS) durant 4 hores a 37°C 5% CO<sub>2</sub>.



## 2.TÈCNIQUES I MÈTODES EXPERIMENTALS

### 2.1. HIBRIDACIÓ *IN SITU*

La tècnica d'hibridació *in situ* ens permet observar en seccions de teixit, i de forma directa, la distribució anatòmica i cel·lular de l'ARNm que codifica per a una determinada proteïna. La detecció d'una cadena simple d'ARNm en seccions de teixit animal requereix de la síntesi i el marcatge d'una sonda apropiada (oligonucleòtids o ribosondes), és a dir, d'una cadena d'àcids nuclèics la seqüència de la qual sigui complementària a l'ARNm de la proteïna en estudi. El procés d'hibridació té lloc gràcies a la formació de ponts d'hidrogen entre bases complementàries: guanina i citosina (G i C, unides per tres ponts d'hidrogen), i adenina i uracil o timidina (A i U o T, unides per només dos ponts d'hidrogen).

En aquest treball es va realitzar hibridació *in situ* mitjançant oligonucleòtids de DNA. Es van realitzar experiments d'hibridació *in situ* senzilla, amb sondes marcades de forma radioactiva amb <sup>33</sup>P. Els procediments es descriuen amb més detall a continuació.

#### 2.1.1.HIBRIDACIÓ *IN SITU* AMB OLIGONUCLEÒTIDS

##### 2.1.1.1.Sondes de DNA

Les sondes d'hibridació que es van utilitzar van ser oligonucleòtids sintètics (de 45 a 48 bases) complementaris a la seqüència d'ARNm en estudi. El seu disseny es va realitzar tenint en compte la seva especificitat per hibridar exclusivament un ARNm segons el percentatge de nucleòtids C i G. Abans de sintetitzar els oligonucleòtids es va comprovar que la seqüència per a cadascun d'ells hibridava únicament amb l'ARNm d'interès mitjançant l'aplicació BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Aquest programa permet la comparació de la seqüència d'un oligonucleòtid concret amb totes les seqüències contingudes en la base de dades (EMBL o GenBank) per assegurar-nos que les nostres sondes no presenten similituds amb altres ARNm que no siguin del nostre interès.

Tots els oligonucleòtids van ser sintetitzats i purificats per HPLC per Isogen Bioscience BV (Maarsden, Holanda).

### 2.1.1.2. Hibridació *in situ* radioactiva

#### 2.1.1.2.1. *Marcatge radioactiu dels oligonucleòtids*

Els oligonucleòtids es van marcar amb  $^{33}\text{P}$ , un isòtop radioactiu que ens permet una detecció ràpida de la senyal d'hibridació i amb gran sensibilitat. Vam utilitzar oligonucleòtids complementaris a l'ARNm que codifica per PDE4A (L27057, 3649-3693 bp), PDE4B (NM\_017009, 2639-2687, 2537-2581 bp), PDE4D (NM\_017032, 1917-1961) i les variants d'*splicing* de PDE4B, PE4B1 (AF202732, 383-427, 506-550 bp), PDE4B2 (L27058, 545-589 bp), PDE4B3 (U95748, 700-744, 616-660, 556-600 bp) i PDE4B4 (AF202733, 264-308, 171-215).

Les sondes es van marcar a l'extrem 3' amb  $^{33}\text{P}$ α-dATP ( $^{33}\text{P}$ α-desoxiadenosina trifosfat, 3000 Ci/mmol; Perkin-Elmer, ) mitjançant l'enzim desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT, 5000 U/ml, Calbiochem, La Jolla, CA, USA). En la reacció de marcatge s'incubaren 2 pmols de sonda, 17 pmols de  $^{33}\text{P}$ α-dATP i 5 unitats de TdT en un tampó de cacodilat de potassi (1mM) i clorur de cobalt (1.5mM) pH 7.2 a 37°C durant 1-2h. La reacció es va aturar escalfant a 65°C durant 5 minuts.

#### 2.1.1.2.2. *Purificació de les sondes marcades*

Els nucleòtids no incorporats en la sonda van ser eliminats de la mescla de la reacció per purificació per cromatografia utilitzant columnes illustra ProbeQuant G-50 Micro Columns (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), que contenen Sephadex™ G-50 DNA Grade F. El principi de purificació de la sonda amb aquestes columnes es basa en la filtració del gel. Les molècules més grans que els porus del Sephadex, en aquest cas els oligonucleòtids marcats radioactivament, són excloses del gel i s'elueixen primer. La mescla de la reacció de marcatge es dilueix en tampó STE (150mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA), es carrega a la columna, prèviament reconstituïda per agitació i centrifugació durant 1 minut a 735 x g, i es centrifuga durant 2 minuts a la mateixa velocitat per recollir l'oligonucleòtid marcat.

#### 2.1.1.2.3. *Preparació del teixit*

En aquest treball es va utilitzar teixit congelat de ratolí, tractat segons un protocol descrit anteriorment pel nostre laboratori (Vilaro et al. 1992).

Les seccions es van descongelar sota un corrent d'aire fred, es van fixar per immersió en una solució del 4% de paraformaldèhid en tampó fosfat salí (1xPBS: 2.6mM KCl, 1.4mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 136mM NaCl, 8mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 7.5) a 4°C durant 20 minuts. Seguidament es

va realitzar un rentat en 3xPBS i dos en 1xPBS, de 5 minuts cadascun. Les seccions es van incubar després a 20°C durant 2 minuts amb pronasa predigerida (24 U/ml, Calbiochem) en 50mM Tris-HCl, pH 7.5, i 5mM EDTA. L'activitat proteolítica de l'enzim es va aturar mitjançant immersió dels teixits en una solució salina de glicina (2 mg/ml en PBS) durant uns 30 segons. Es van rentar dos cops durant 30 segons en 1xPBS, i finalment es van deshidratar en etanol del 70 i el 100%, 2 minuts en cadascun.

### *2.1.1.2.4. Hibridació del teixit*

Les sondes van utilitzar-se a una concentració final de  $1.5-3 \times 10^7$  cpm/ml en un tampó que contenia formamida al 50%, 4xSSC (1xSSC: 150mM NaCl, 15mM citrat sòdic), 1x solució de Denhardt (0.02% Ficoll, 0.02% polivinilpirrolidona, 0.02% albúmina de sèrum boví), 10% de sulfat de dextrà, 1% sarkosil, 20mM tampó de fosfat sòdic pH 7.0, 250 µg/ml d'ARNt de llevat i 500 µg/ml d'ADN d'esperma de salmó (Cortes et al. 1993).

Per la hibridació les seccions de teixit es van incubar amb 100 µl d'aquesta solució i recoberts amb Nescofilm (Bando Chemical Ind., Kobe, Japó) per evitar l'evaporació de la mescla. La hibridació es va realitzar dins de caixes amb un ambient humit durant 16-20h en un incubador a 42°C.

### *2.1.1.2.5. Rentats*

Per tal d'eliminar l'excés de sonda no hibridada o que s'uneix de forma inespecífica al teixit, es van submergir els portaobjectes hibridats en tampó de rentat (0.6M NaCl, 10mM Tris-HCl pH 7.5). Es van realitzar quatre rentats de 45 minuts a 60°C. Finalment els teixits es van deshidratar en dos gradients d'etanol del 70 i el 100%, 5 minuts en cadascun, a temperatura ambient.

### *2.1.1.2.6. Exposició i obtenció dels autorradiogrames*

Els autorradiogrames es van obtenir per exposició de les seccions de teixit hibridades a una pel·lícula fotogràfica Biomax-MR (Kodak, Rochester, USA). L'exposició es va realitzar a -80°C, temperatura necessària perquè tinguin efecte les pantalles intensificadoras de l'emissió radioactiva de  $^{33}\text{P}$ , durant un temps variable (d'entre 2 a 4 setmanes) en funció de la intensitat de la senyal generada per la sonda radioactiva hibridada. Al finalitzar l'exposició, les pel·lícules fotogràfiques es van revelar amb LX24 (Kodak), es fixaren amb AL4 (Kodak), durant 5 minuts cadascun a 21°C, i es van rentar durant 10 minuts en aigua corrent i uns segons amb aigua destil·lada. Aquest mètode permet l'observació macroscòpica de les regions que expressen amb més abundància l'ARNm d'interès.

Per a la visualització microscòpica de l'ARNm sobre els cossos cel·lulars, es va utilitzar una tècnica d'immersió en emulsió fotogràfica líquida o *dipping*. Aquesta tècnica consisteix en submergir els portaobjectes amb les seccions híbrides en una emulsió fotogràfica de sals de plata (emulsió nuclear K5, Ilford, Mobberly, UK), prèviament diluïda 1:1 amb aigua destil·lada, a 42°C. L'exposició es va realitzar durant un període variable d'entre 1 i 2 mesos a 4°C. Passat aquest temps, les seccions es van revelar amb D-19 (Kodak) i es van fixar amb Hypam (Ilford), durant 5 minuts cadascuna, i es van muntar amb Mowiol (Calbiochem). Algunes d'aquestes seccions es van tenyir amb violeta de cresil (0.25%) per tal de poder observar de forma conjunta els cossos cel·lulars i la senyal autorradiogràfica en forma de precipitats de grans de plata.

#### 2.1.1.2.7. Controls d'especificitat

Els oligonucleòtids poden unir-se a altres components del teixit com lípids, ADN o ARN no homòlegs, donant una senyal inespecífica. Per aquest motiu es van realitzar diversos controls d'especificitat per tal d'optimitzar les condicions experimentals per la hibridació de les diferents sondes.

- Comprovació de la coincidència del patró d'expressió de diferents oligonucleòtids complementaris per diferents regions del mateix ARNm. Per cada ARNm en estudi es van provar dues o més sondes diferents de forma independent en seccions consecutives del mateix animal i que mostraren patrons d'hibridació idèntics.
- Cohibridació de la sonda marcada amb un excés del mateix oligonucleòtid sense marcar (de 100 a 1000 vegades la concentració de l'oligonucleòtid marcat). El resultat és una abolició per complet de la senyal d'hibridació específica; el senyal autorradiogràfic restant es considera com a soroll de fons.
- Anàlisi de l'estabilitat tèrmica dels híbrids formats. Es va realitzar rentant seccions consecutives híbrides amb una mateixa sonda a temperatures creixents de 50, 60 i 80°C. Quan la hibridació és específica, s'observa un descens brusc de la intensitat de senyal a temperatures properes a la  $T_m$  dels híbrids (temperatura a la que es dissocien el 50% dels híbrids). Això ens va permetre trobar la temperatura òptima de rentat per cada sonda, que sempre ha de ser inferior a la  $T_m$ , i que en aquest cas va ser de 60°C per totes les sondes utilitzades en aquest treball.
- Verificació de que la senyal obtinguda prové de cossos cel·lulars mitjançant la tècnica de *dipping*.

## 2.2. qRT-PCR o PCR SEMIQUANTITATIVA DE TRANSCRIPCIÓ INVERSA

La tècnica de PCR ens permet detectar els nivells d'expressió d'un ARNm de forma quantitativa o semiquantitativa del teixit o de les cèl·lules en estudi. En aquest cas hem utilitzat l'expressió semiquantitativa com a mètode d'anàlisi, comparant l'expressió de cada ARNm en estudi entre mostres anomenades "casos" i mostres "control".

Parlem de PCR de transcripció inversa ja que l'ARN extret del teixit en estudi es retrotranscriu a ADN complementari (ADNc) mitjançant l'enzim transcriptasa inversa i el producte resultant és el que s'amplifica en la PCR.

### 2.2.1. EXTRACCIÓ DE L'ARN DE LES MEDUL·LES ESPINALS CERVICALS

Segments cervicals de les medul·les espinals (10-15 mg) es van homogeneïtzar mitjançant el reactiu de Trizol<sup>®</sup> i un aparell homogeneïtzador de teixits (Polytron PT1200, Kinematica AG). L'ARN total es va aïllar utilitzant el kit PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

S'utilitza 1ml de Trizol<sup>®</sup> per cada 50-100 mg de teixit congelat (la mostra no hauria de sobrepassar el 10% del volum de Trizol<sup>®</sup>). L'extracció de l'ARN d'aquest kit es basa en la combinació de la lisis de guanidina-isocianat i de la utilització de columnes de silica-gel que uneixen de forma específica l'ARN, per tal d'eluir-lo en l'últim pas de la purificació i utilitzar-lo per la RT-PCR. Les mostres d'ARN es van tractar amb DNase I (Invitrogen) per eliminar l'ADN genòmic i que aquest no interferís en la RT-PCR.

En tot moment es va utilitzar material lliure de RNases i es va treballar en una zona lliure de RNases mitjançant la neteja amb RNaseZap (Ambion, Carlsbad, CA, USA).

La mostra d'ARN obtinguda es va quantificar mitjançant un espectofotòmetre (NanoDrop, mesurant l'absorció a 260 i 280 nm i determinant la concentració d'ARN de la mostra. 1 µl de cada mostra va ser emprat per analitzar el número d'integritat de l'ARN (*RNA integrity number*, RIN), que determina la qualitat d'aquest ARN. S'avalua mitjançant la ratio entre l'ARN ribosòmic 28S i 18S, donant valors entre 1 i 10. En aquest treball només es van utilitzar mostres amb un RIN superior a 5. Les mostres es van guardar a -80°C fins a la seva utilització.

### 2.2.2. RT-PCR

Mostres d'ARN total, d'1 µg cadascuna, es van retrotranscriure a ADNc mitjançant el kit iScript (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). El cicle de transcripció inversa és de 5min a 25°C,

30min a 42°C i 5min a 85°C. Un cop finalitzat, les mostres es van guardar a -20°C fins a ser utilitzades. La quantificació de l'ARNm per a cadascun dels gens estudiats es va realitzar amb el kit SsoFast EvaGreen® Supermix (Bio-Rad) en triplicats amb un volum de reacció de 20 µl en cada triplicat. L' EvaGreen® és un fluoròfor incorporat als nucleòtids que es comporta de forma similar al SYBR® Green i que es llegeix a la mateixa longitud d'ona, però que presenta una major sensibilitat. Els primers utilitzats van ser sintetitzats per Biomers.net GmbH (Ulm, Germany) a una concentració final de 300 nM i les seves seqüències es troben detallades a la **Taula 1**.

**Taula 1.** Llista dels primers utilitzats en la RT-PCR per a cadascun dels gens analitzats. Es detalla la seva seqüència, el número d'accés a GenBank, la seva temperatura òptima d'*annealing* i el % d'eficiència.

Gen	Seqüència primers	Núm. GenBank	Temperatura <i>annealing</i>	Eficiència %
PDE4A	Sense 5'-CTTCTGCGAGACCTGCTCCA-OH Antisense 5'-GAGTTCCCGGTTCCAGCATCC-OH	NM_019798.5	60°C	106,2
PDE4B	Sense 5'-GCCACTGGATGAGAGGAGCA-OH Antisense 5'-CCTTTTCCGGTCCCTCAGAA-OH	NM_019840.2	60°C	91,3
PDE4B2	Sense 5'-CGGCAAGCAAACAATGAAGG-OH Antisense 5'-CTGGCCATAGCCGAGTCTCC-OH	BC023751	60°C	93,9
PDE4D	Sense 5'- ACCGCCAGTGGACGGACCGGA-OH Antisense 5'- CATGCCACGCTCCCGCTCTCGG-OH	NM_011056.2	60°C	110,2
IL-17A	Sense 5'- GAAGCTCAGTGCCGCCA-OH Antisense 5'- TTCATGTGGTGGTCCAGCTTT-OH	NM_010552	60°C	108,5
FoxP3	Sense 5'- GGCCCTTCTCCAGGACAGA-OH Antisense 5'- CTGATCATGGCTGGGTTGT-OH	NM_054039	60°C	92,7
TNF $\alpha$	Sense 5'- TGATCCGCGACGTGGAA-OH Antisense 5'- ACCGCCTGGAGTTCTGGAA-OH	NM_013693.2	60°C	111,2
IFN- $\gamma$	Sense 5'- TGCTGATGGGAGGAGATGTCT-OH Antisense 5'- TTTCTTTCAGGGACAGCCTGTT-OH	NM_008337	60°C	107,1
IL-1 $\beta$	Sense 5'- TGGTGTGTGACGTTCCCATTA-OH Antisense 5'- CAGCACGAGGCTTTTTTGTG-OH	NM_008361.3	60°C	108,7
IL-6	Sense 5'- CCAGTTTGGTAGCATCCATC-OH Antisense 5'- CCGCAGAGGAGACTTCACAG-OH	NM_031168.1	60°C	108,2
TGF- $\beta$	Sense 5'- TGCCTTGCAGAGATTAATA-OH Antisense 5'- AGCCCTGTATTCCGTCTCT-OH	NM_011577.1	61,8°C	105,4
Tbx21	Sense 5'- GGACGATCATCTGGGTACATTGT-OH Antisense 5'- GCCAGGGAACCGCTTATATG-OH	NM_019507	61,8°C	108,1
Gata3	Sense 5'- TCTGGAGGAGGAACGCTAATG-OH Antisense 5'- GGCTGGAGTGGCTGAAGG-OH	NM_008091	61,8°C	107,6
Rorc	Sense 5'- AGCAGTGTAAATGTGGCCTAC-OH Antisense 5'- GCACTTCTGCATGTAGACTG-OH	NM_011281	62°C	102,1
HPRT	Sense 5'- TGGTGAAGGACCTCTCGAA-OH Antisense 5'- TCAAGGGCATATCCAACAACA-OH	NM_013556	60°C 62°C	98,2 90,9

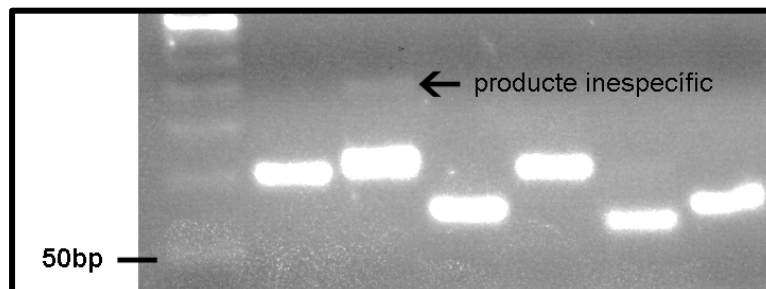
Es van utilitzar 10 ng d'ARN de les mostres per a la seva amplificació en cadascun dels triplicats. Les mostres es van processar en un iCycler iQ (Bio-Rad) i els resultats es van analitzar mitjançant el software del mateix equip. Per a la quantificació relativa, *n*-vegades la diferència d'expressió es va determinar mitjançant el mètode de comparació dels llindars de cicle (*cycle threshold*, CT) o mètode Pfaffl ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ), normalitzant cadascun dels gens estudiats a un gen de referència, *hypoxanthine phosphoribosyltransferase* (HPRT), un enzim implicat en el metabolisme de les purines i àmpliament usat com a gen de referència. Per tal de validar cadascun dels primers, es van realitzar RT-PCRs per

## Materials i Mètodes

determinar la seva eficiència. Això es va fer mitjançant l'amplificació de concentracions seriades d'ARN per tal d'establir una recta estàndard i d'aquesta manera l'eficiència de PCR de cada *primer* usat. Es van considerar *primers* amb una eficiència correcta entre 90 i 110%. També es van amplificar els gens amb un gradient de temperatura en la part d'aparellament o *annealing* del cicle per tal d'establir quina temperatura oferiria una millor eficiència del *primer*. L'eficiència i la temperatura òptima d'aparellament per a cada *primer* es detallen a la **Taula 1**. Es va afegir un protocol de fusió o *melting* del protocol d'amplificació per tal de verificar que no es produïa dimerització entre els *primers* durant la reacció.

Es van utilitzar protocols diferents de 40 cicles segons els *primers*: PDE4A, PDE4B, PDE4B2, PDE4D, IL-17A, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  i IL-6 (30s a 95°C, 1min a 60°C i 30s a 72°C); FoxP3 (1min a 95°C, 1min a 60°C i 1min a 72°C); TGF- $\beta$ , Tbx21, Gata3 i Rorc (30s a 95°C, 1min a 62°C i 30s a 72°C).

Els productes o transcrits resultants de la reacció es van visualitzar mitjançant SYBRSafe (Invitrogen) en gels d'agarosa al 3,4% per tal de comprovar que la seva longitud era la correcta i que no es produïen amplificacions inespecífiques d'altres transcrits (**Figura 1**).



**Figura 1.** Detecció per SYBRSafe dels transcrits amplificats per RT-PCR en un gel d'agarosa. Si l'amplificació és correcta, només es detecta una banda. Aquí es senyala la detecció d'una segona banda degut a amplificació inespecífica.



## 2.3. IMMUNOHISTOQUÍMICA

Aquesta tècnica ens permet conèixer a nivell cel·lular la localització de proteïnes en el teixit. La seva visualització depèn de l'especificitat de l'anticòs per la proteïna i de la tècnica de detecció o revelat que s'utilitzi. En aquest treball es van utilitzar dues tècniques diferents: detecció per anticòs secundari conjugat biotina que forma un complex amb estreptavidina i reacciona amb la diaminobenzidina (DAB) per donar lloc a un precipitat de color marró; detecció per anticòs secundari conjugat amb un fluoròfor que emet llum fluorescent al ser excitat per una determinada longitud d'ona.

### 2.3.1. PREPARACIÓ DEL TEIXIT

Es van utilitzar seccions consecutives de talls coronals de teixit de ratolí congelat, igual que per la hibridació *in situ*. Les seccions es van descongelar a temperatura ambient, es van fixar per immersió en una solució del 4% de paraformaldèhid en 1xPBS a 4°C durant 20 minuts. Seguidament es van realitzar dos rentats en 1xPBS, de 5 minuts cadascun.

### 2.3.2. ANTICOSSOS UTILITZATS

**Taula 2.** Anticòs primaris

Anticòs	Antigen	Població cel·lular	Dilució	Casa comercial
rabbit anti- PDE4B	PDE4B	-	1:50	Dr. Cherry
rabbit anti-PDE4B	PDE4B	-	1:200	FabGennix Inc., Frisco, TX, USA
rat anti-mouse CD11b	CD11b	Micròglia, macròfags, cèl·lules dendrítiques, cèl·lules de Kupfer, granulòcits	1:100	AbD Serotec, Oxford, UK
hamster anti-mouse CD11c	CD11c	Cèl·lules dendrítiques i algunes cèl·lules T activades	1:100	eBioscience, San Diego, CA, USA
rabbit anti-CD3	CD3ε	Limfòcits T, cèl·lules NK	1:100	Dako, Glostrup, Denmark
rabbit anti-Iba1	Iba1	Micròglia i macròfags	1:500	Wako, Neuss, Germany
rat anti-mouse MBP	MBP	Oligodendròcits mielinitzants	1:200	Abcam, Cambridge, UK
rat anti-mouse Neutrophil	Membrana neutròfils	Neutròfils	1:100	Abcam, Cambridge, UK
mouse anti-mouse GFAP	GFAP	Astròcits i glia de Bergmann	1:500	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany



Taula 3. Anticossos secundaris

Anticòs	Espècie hoste	Dilució	Casa comercial
biotinylated anti-rabbit IgG (H+L)	goat	1:100	Vector Lab., Burlingame, CA, USA
anti-rabbit IgG Alexa Fluor® 555	donkey	1:500	Molecular Probes, Leiden, Netherlands
anti-mouse IgG Alexa Fluor® 488	goat	1:500	Molecular Probes, Leiden, Netherlands
anti-rat IgG Alexa Fluor® 488	goat	1:500	Molecular Probes, Leiden, Netherlands

### 2.3.3. PROTOCOL D'IMMUNOHISTOQUÍMICA

#### 2.3.3.1. Revelat amb DAB

Les seccions es van incubar 15min en una solució 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma) en 1xPBS. Després de rentar 5min en 1xPBS, es va realitzar una pre-incubació (15min a temperatura ambient) i la incubació amb l'anticòs primari (1h a 37°C) en una solució 1xPBS amb 2% de *normal goat serum* (NGS, Vector Lab.); posteriorment, la incubació amb l'anticòs secundari biotinilat (30min a 37°C) en 1xPBS amb 2% NGS. L'excés d'anticòs es va eliminar amb tres rentats en 1xPBS a temperatura ambient. A continuació es van incubar les seccions amb la solució ABC del kit Vectastain Elite ABC (Vector Lab.) a 37°C durant 30min. La reacció colorimètrica es va realitzar amb una solució amb DAB (0.05M Tris-HCl; 0.3mg/ml DAB; 0.64mg/ml NaN<sub>3</sub>; 0.06mg/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durant 5-10min a temperatura ambient. Finalment es van rentar els talls en 1xPBS i aigua destil·lada, i es van muntar amb Mowiol per tal de poder observar-los al microscopi.

#### 2.3.3.2. Immunofluorescència

Després de rentar 5min en 1xTBS (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7.4), es va realitzar una pre-incubació (1h a temperatura ambient) i la incubació amb l'anticòs primari (tota la nit a 4°C) en una solució 1xTBS amb 10% de NGS i 0.05% Triton X-100; posteriorment, la incubació amb l'anticòs secundari fluorescent (1h a temperatura ambient) en 1xTBS amb 5% NGS i 0.05% Triton X-100. L'excés d'anticòs es va eliminar amb tres rentats en 1xTBS a temperatura ambient. Finalment es van rentar les seccions en aigua destil·lada, i es van muntar amb VECTASHIELD® + DAPI (Vector Lab.) per tal de tenyir els nuclis de les cèl·lules i poder observar-los al microscopi.

En el cas d'immunofluorescència doble, es va seguir el mateix protocol incubant els dos anticossos (tant primaris com secundaris) de forma conjunta. Pel que fa a la immunofluorescència doble amb dos anticossos secundaris generats en la mateixa

espècie (rabbit anti-PDE4B + rabbit anti-CD3 o rabbit anti-Iba1), primer es va realitzar el protocol per un anticòs i, seguidament després dels rentats amb 1xTBS, es va realitzar el mateix protocol per l'altre anticòs.

## 2.4. TINCIONS HISTOLÒGIQUES

### 2.4.1.VIOLETA DE CRESIL (TINCIÓ DE NISSL)

El violeta de cresil interactua amb els àcids nucleics i marca tant el nucli cel·lular com el citoplasma. L'hem utilitzat per determinar zones d'infiltració cel·lular en les mateixes seccions histològiques utilitzades per hibridació *in situ*.

Les seccions de teixit es van incubar durant 10min a temperatura ambient en una solució al 0.25% de violeta de cresil (Sigma), es van rentar en aigua destil·lada i es van deshidratar en concentracions creixents d'etanol. Es van incubar dos cops durant 5 min en Histoclear (National Diagnostics, Heesle Hull, UK) i es van muntar amb Entellan (Merck).

### 2.4.2.LUXOL FAST BLUE

Aquest producte tenyeix de forma específica la mielina. Es va utilitzar en seccions pròximes a les utilitzades pels experiments d'hibridació *in situ* i immunohistoquímica.

Les seccions es van descongelar sota un corrent d'aire fred, es van fixar per immersió en una solució del 4% de paraformaldèhid en 1xPBS a 4°C durant 20 minuts i es van rentar en 1xPBS dues vegades durant 5min. Després d'incubar-les durant 4-8h en una solució 1:1 d'alcohol/cloroform, es van rehidratar en alcohol 95%. La tinció es va realitzar amb una solució de Solvent Blue 38 (Sigma-Aldrich) al 0.1%, incubant els teixits tota la nit a 56°C, seguit per una incubació de pocs segons en una solució de carbonat liti al 0.05% en alcohol per tal de diferenciar entre substància blanca i substància gris en el talls de cervell i medul·la espinal. Després de rentar les seccions en aigua, es van tenyir les cèl·lules en violeta de cresil durant 30-40s, es van tornar a rentar en aigua, es van submergir durant 1s en xilè i es van muntar amb Entellan.

### 2.4.3.FLUOROJADE B

El FluoroJade és un fluorocrom derivat de la fluoresceïna que marca de forma específica les neurones en degeneració.

Les seccions es van descongelar sota un corrent d'aire fred, es van fixar per immersió en una solució del 4% de paraformaldèhid en 1xPBS a 4°C durant 20 minuts i es van rentar en aigua destil·lada durant 2min. Seguidament es van incubar en una solució 1% NaOH en alcohol al 80%; en etanol al 70%; i en una solució de KMnO<sub>4</sub> al 0.06%. La tinció es va realitzar amb 4ml d'una solució estoc (0.01% FluoroJade B en aigua destil·lada) en 96ml d'àcid acètic al 0.1% durant 20min a temperatura ambient i protegit de la llum. Es van rentar les seccions amb aigua destil·lada i es van assecar durant 5-10min a 50°C. Es van submergir durant 1min en xilè i es van muntar amb Entellan.

### 2.5. ESTIMULACIÓ DE LEUCÒCITS *IN VITRO* I ELISA

Per tal d'avaluar la resposta inflamatòria dels leucòcits en ratolins EAE *wt*, PDE4B<sup>-/-</sup> i PDE4A<sup>-/-</sup> es van realitzar estimulacions *in vitro* amb l'antigen de mielina utilitzats per la immunització.

#### 2.5.1. ESTIMULACIÓ DE LEUCÒCITS *IN VITRO* AMB MOG<sub>35-55</sub>

Els leucòcits aïllats de la melsa en cultiu (Apartat 1.2) foren estimulats amb 25 µg/ml del pèptid MOG<sub>35-55</sub> i els sobrenedants d'aquestes cèl·lules van ser recollits 24, 48, 72 i 120h post-estimulació. Les mostres es van congelar de forma immediata en neu carbònica i es van guardar a -20°C fins a la seva utilització.

#### 2.5.2. DETECCIÓ DE CITOCINES PER ELISA

En els sobrenedants recollits dels cultius de leucòcits es va detectar la presència de diverses citocines mitjançant la tècnica d'ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* o Assaig per Immunoabsorció Lligat a Enzims). Aquesta tècnica es basa en la presència d'un anticòs immobilitzat que capta l'antigen (en aquest cas la citocina) i un altre anticòs que reconeix aquest antigen conjugat a un enzim que produirà una reacció colorimètrica al afegir-hi el seu substrat.

Es van utilitzar els kits: Mouse TNF alpha ELISA Ready-SET-Go!<sup>®</sup> (eBioscience, San Diego, CA, USA) per a la detecció de TNF-α; Mouse IL-4 ELISA Ready-SET-Go!<sup>®</sup> (eBioscience) per a la detecció d'IL-4; i BD OptEIA<sup>™</sup> Mouse IFN-γ ELISA Kit II (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) per a la detecció IFN-γ. La reacció colorimètrica es va quantificar en un espectrofotòmetre. En cada placa es van analitzar concentracions

seriades de l'antigen a detectar per tal de construir una recta patró i extrapolar així les densitats òptiques relatives obtingudes a concentracions de pg/ml.

## 2.6. ANÀLISIS DELS RESULTATS

### 2.6.1. HIBRIDACIÓ *IN SITU* RADIOACTIVA

Les seccions es van examinar en camp fosc en un microscopi Zeiss Axioplan (Zeiss, Oberkochen, Germany) equipat amb un condensador de camp fosc. Un il·luminador Darklite (Micro Video Instruments, Avon, MA, USA) es va utilitzar per millorar la visualització dels grans de plata de les seccions histològiques híbrides.

### 2.6.2. IMMUNOHISTOQUÍMICA

Les seccions de teixit revelades amb DAB o d'immunofluorescència es van observar mitjançant un Olympus BX51 Stereo Microscope (Olympus, Tokyo, Japan) equipat amb filtres específics per detectar en camp clar les emissions dels fluoròfors conjugats amb els anticossos secundaris.

### 2.6.3. PREPARACIÓ DE LES FIGURES

Les fotografies dels films autorradiogràfics de les seccions híbrides es van obtenir a través d'un macroscopi Wild 420 (Leica, Solms, Germany) equipat amb una càmera digital DXM1200 F (Nikon, Tokyo, Japan) i els software ACT-1 Nikon. Les microfotografies de les seccions híbrides i d'immunohistoquímica amb DAB es van fer en un microscopi Zeiss Axioplan equipat amb l'il·luminador Darklite i la càmera digital DXM1200 F (Nikon) i el software ACT-1 Nikon. Les seccions d'immunofluorescència es van fotografiar en l'Olympus BX51 Stereo Microscope equipat amb la càmera digital DP71 (Olympus).

Els fotomuntatges de les figures es van preparar amb el programa Adobe Photoshop CS4 (Adobe Software, San Jose, CA, USA). Els únics paràmetres que es van modificar digitalment foren la brillantor i el contrast. Per les seccions d'immunofluorescència doble es va utilitzar aquest mateix programa per fusionar la senyal dels dos fluoròfors en la mateixa imatge.

### 2.6.4. AMPLIFICACIÓ PER RT-PCR

Els resultats obtinguts van ser analitzats mitjançant el programa iCycler (Bio-Rad), per tal d'obtenir els CTs per a cadascun dels triplicats de la placa. L'expressió relativa es va calcular segons el mètode  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Els gràfics i l'anàlisi estadístic de les dades es va dur a

terme amb el programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

#### 2.6.5.DETECCIÓ DE CITOCINES PER ELISA

Un cop extrapolats els valors obtinguts per espectrofotometria a partir de la recta patró obtinguda, les gràfiques per a les concentracions de cadascuna de les citocines analitzades i l'anàlisi estadístic dels resultats es va realitzar mitjançant el programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc.).

***Resultats***

## 1. Estudi del model animal d'EAE en ratolins *wildtype*

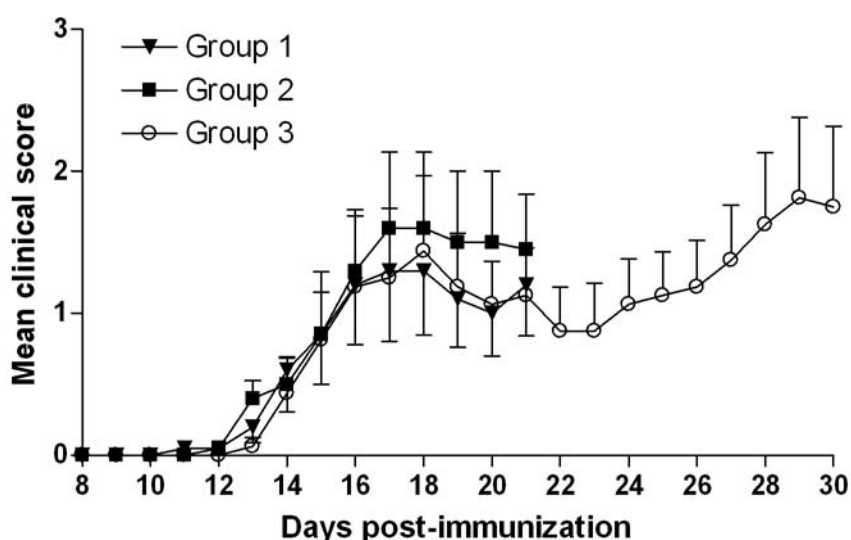
El primer objectiu d'aquest treball fou la posada a punt del model animal d'EAE en ratolins *wildtype* de la soca C57BL6. Per tal de validar el nostre model i poder-lo utilitzar en estudis posteriors, volíem determinar les característiques clíniques i histopatològiques de la malaltia, així com la resposta neuroinflamatòria produïda per la immunització.

La monitorització dels animals durant un període de 30 dies en relació a l'aparició de simptomatologia clínica ens va permetre establir l'incidència de la malaltia en els nostres grups de ratolins, així com el dia d'aparició dels primers símptomes (**Taula 1**) i l'evolució d'aquests durant el transcurs de la malaltia (**Figura 1**).

**Taula 1.** Incidència, dia d'inici dels símptomes i mortalitat durant el transcurs de l'EAE en els tres grups de ratolins *wildtype* utilitzats.

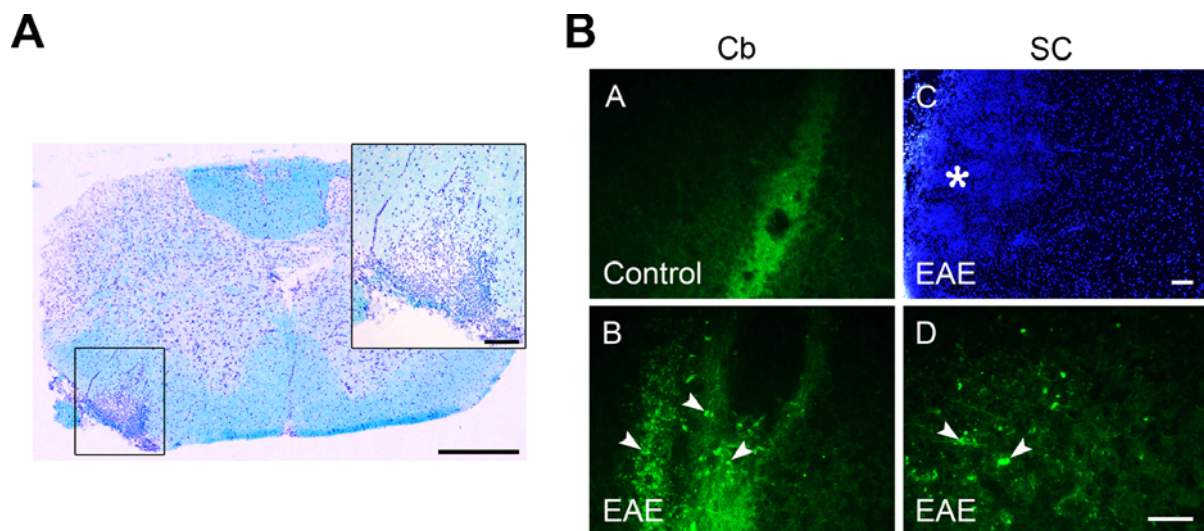
	Incidència	Dia d'inici	Mortalitat
<b>Grup 1 (n=10)</b>	7/10 (70 %)	14 ± 2	0/10
<b>Grup 2 (n=10)</b>	8/10 (80 %)	14 ± 3	0/10
<b>Grup 3 (n=8)</b>	6/8 (75 %)	15 ± 2	0/8

Els animals comencen a mostrar dèficits neurològics al voltant del dia 14 post-immunització (p.i.) i arriben a un pic entre els dies 17 i 21. En aquest treball ens vam centrar en la resposta dels animals abans de l'aparició de la malaltia (dia 10), just després de l'aparició dels símptomes (dia 15), al voltant del pic (dia 21), i fins el dia 30.



**Figura 1.** Evolució dels símptomes clínics en el model EAE en ratolins *wildtype*. Els valors representen la Mitjana ± SEM de tres grups experimentals independents. Els grups 1 i 2 foren sacrificats al dia 21 post-immunització, mentre que els ratolins del grup 3 es van mantenir fins el dia 30.

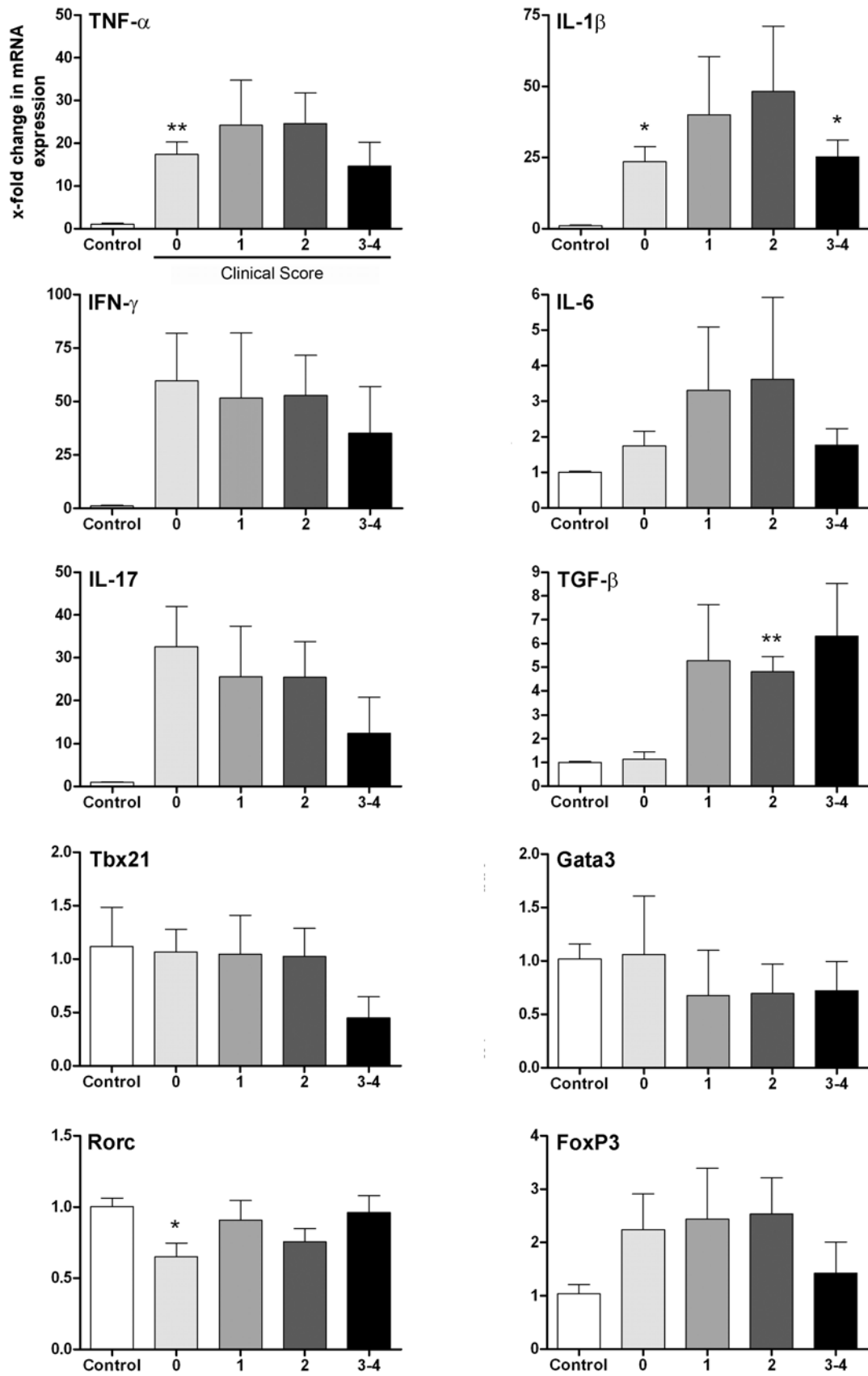
Un cop determinades les característiques clíniques del model animal d'Esclerosis Múltiple (EM), vam voler correlacionar-les amb canvis histopatològics a nivell del SNC. En seccions coronals de medul·la espinal de ratolins sacrificats 30 dies p.i. vam poder observar la presència de zones de desmielinització en regions que presentaven una abundant infiltració cel·lular (**Figura 2A**). També es va poder detectar degeneració neuronal a nivell de cerebel i medul·la espinal coincidint amb focus d'infiltració (**Figura 2B**). Experiments d'immunohistoquímica per la proteïna SMI32 (neurofilament-H hiperfosforilat que en EAE i EM es detecta en axons danyats) van determinar que es produïa també dany axonal a nivell del SNC en els ratolins amb EAE.



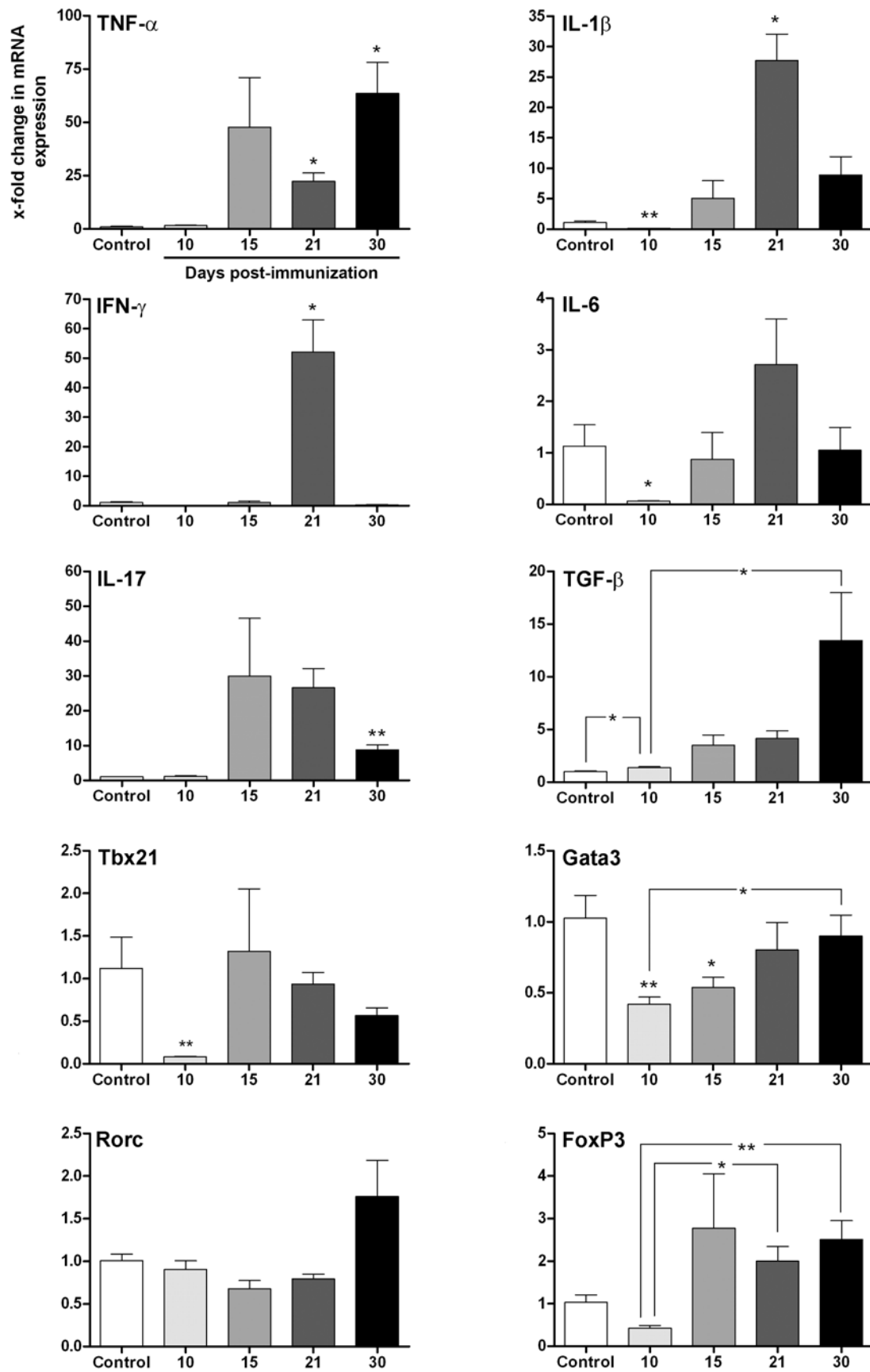
**Figura 2.** Característiques histopatològiques del model EAE. **(A)** Tinció de Luxol Fast Blue + Violeta de Cresil en medul·la espinal d'un ratolí EAE 30 post-immunització. El quadre d'ampliació detalla una zona d'elevada infiltració cel·lular (Violeta de Cresil) on es pot observar desmielinització (Luxol Fast Blue). **(B)** Tinció de FluoroJade B, marcador de neurodegeneració, en cerebel i medul·la espinal d'un animal EAE 21 dies post-immunització. La tinció és negativa en el cerebel (Cb) d'un animal control (A), mentre que es pot observar tinció de neurones en degeneració (fletxes) en els talls de cerebel i medul·la espinal (SC) d'un animal EAE (B i D). Aquestes coincideixen amb regions d'elevada infiltració cel·lular (DAPI<sup>+</sup>) en la medul·la espinal (asterisc) (C). **(A)** Barres = 0,5mm i 100μm. **(B)** Barra = 50μm.

Per tal d'avaluar la resposta neuroimmunitària en aquests animals, es van determinar els nivells d'expressió per RT-PCR de l'ARNm de diversos marcadors inflamatoris i de sistema immune en la regió cervical de la medul·la espinal, on havíem pogut detectar els canvis histopatològics descrits anteriorment. Es van analitzar els nivells d'expressió de citocines proinflamatòries (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-17) i antiinflamatòries (TGF- $\beta$ ), i factors de transcripció característics de les diverses subpoblacions de cèl·lules T implicades en el model d'EAE com Th1 (Tbx 21), Th2 (Gata 3), Th17 (Rorc) i Tregs (FoxP3), separant els grups experimentals per puntuació clínica (**Figura 3**) o bé per dies p.i. (**Figura 4**).





**Figura 3.** Canvis d'expressió de l'ARNm de diversos marcadors de resposta immune en medul·la espinal de ratolins EAE 21 dies post-immunització amb diferent simptomatologia clínica (*Mean clinical score*). Les barres representen la Mitjana  $\pm$  SEM, \*  $P < 0.05$  i \*\*  $P < 0.01$ .  $n=25$ .



**Figura 4.** Canvis d'expressió de l'ARNm de diversos marcadors de resposta immune en medul·la espinal de ratolins EAE a diferents temps post-immunització. Les barres representen la Mitjana  $\pm$  SEM, \*  $P < 0.05$  i \*\*  $P < 0.01$ .  $n=5$  per a cada grup experimental.

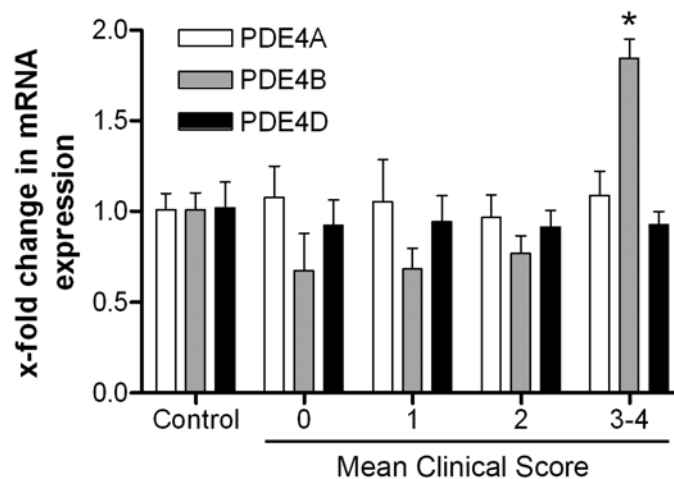
Els resultats confirmen la presència d'una resposta immune i neuroinflamatòria en els animals als quals se'ls ha induït l'EAE, en alguns casos independentment de si presenten simptomatologia clínica o no.

En relació a la puntuació clínica dels animals, els resultats mostren un augment d'expressió de l'ARNm de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  i IL-6 respecte el grup control (immunitzat amb CFA però sense el pèptid de MOG<sub>35-55</sub>), de forma independent a la presència de símptomes. També s'observa un augment de l'ARNm de la citocina antiinflamatòria TGF- $\beta$  en els grups d'animals que presentaven simptomatologia clínica. En el cas d'IL-17, els resultats mostren una tendència a la sobreexpressió sobretot en animals sense símptomes d'EAE o amb simptomatologia menys severa. Pel que fa als marcadors de cèl·lules T, no s'observen canvis per a Gata3 (marcador de cèl·lules Th2), mentre que hi ha una disminució significativa de l'expressió de Rorc (marcador de cèl·lules Th17) en el grup d'animals sense símptomes de la malaltia, i una tendència a la sobreexpressió de FoxP3 (marcador de Tregs) en tots els grups de ratolins amb EAE (**Figura 3**).

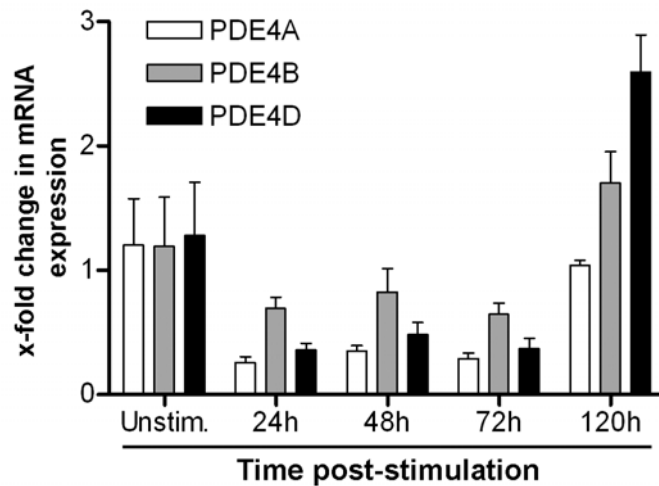
Segons els dies p.i., els resultats obtinguts mostren una disminució d'IL-1 $\beta$  i IL-6 respecte els animals control amb CFA als 10 dies p.i., amb un pic de sobreexpressió als 21 dies p.i. Aquest pic també s'observa per IFN- $\gamma$ . En el cas de TNF- $\alpha$  i IL-17, es detecta un augment de la seva expressió a partir del dia 15 p.i. Pel que fa a la citocina antiinflamatòria TGF- $\beta$  es va observar una sobreexpressió del seu ARNm a 30 dies p.i. Vam detectar una tendència a l'augment per Rorc en el grup de 30 dies p.i. i una disminució significativa respecte el grup control de l'expressió de Tbx21 (marcador de cèl·lules Th1) en el grup de 10 dies p.i.

## 2. Canvis en l'expressió de l'ARNm de les PDE de la família 4 en el model EAE en ratolins *wildtype*

Mitjançant RT-PCR de l'ARN extret de seccions medul·lars de ratolins EAE 10, 15, 21 i 30 p.i. vam voler analitzar si es produïen canvis en l'expressió de l'ARNm de les 3 isoformes de PDE4 que s'expressen a nivell del SNC i sistema immune, com són PDE4A, PDE4B i PDE4D (**Figura 5**). També vam intentar determinar quin era el patró d'expressió per aquestes isoformes a diversos temps post-estimulació amb l'antigen de mielina MOG<sub>35-55</sub>. Per tal de determinar-ho, es van realitzar cultius primaris de limfòcits i macròfags de melsa de ratolins EAE sacrificats 12 dies p.i. Es van estimular les cèl·lules amb MOG<sub>35-55</sub> i es van analitzar els nivells d'expressió de les isoformes de PDE4 a 24, 48, 72 i 120 hores post-estimulació (**Figura 6**). Els resultats mostren un augment significatiu de l'expressió de PDE4B 30 dies p.i. respecte el grup control, però també un augment de PDE4A i PDE4D respecte el grup d'animals de 21 dies p.i.; i una tendència d'augment en l'expressió de l'ARNm de PDE4B i sobretot PDE4D a les 120h post-estimulació antigènica dels cultius primaris de melsa.

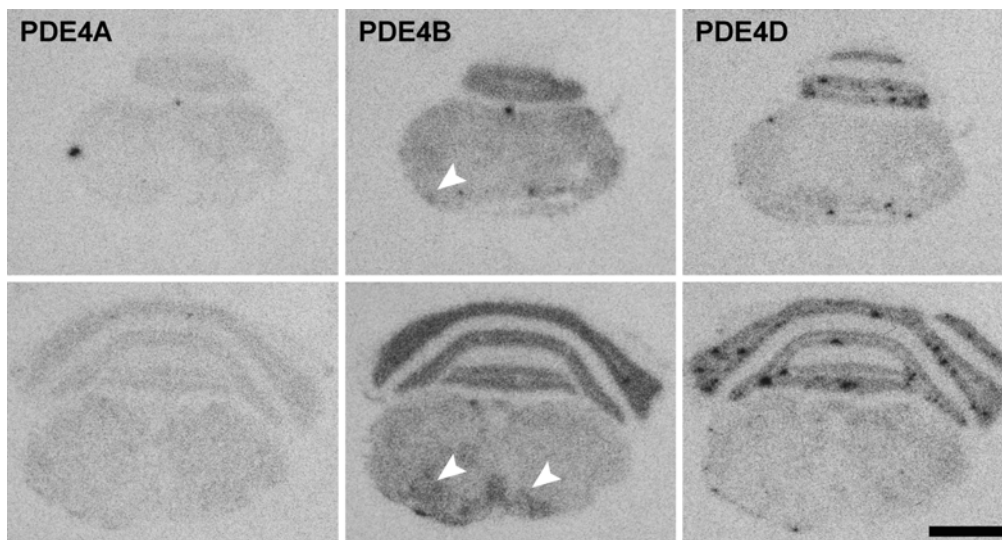


**Figura 5.** Canvis d'expressió de l'ARNm de les diferents isoformes de PDE4 en medul·la espinal de ratolins *wf* EAE a diferents dies pos-immunització. Els resultats mostren els canvis d'expressió respecte els diferents grups. Els valors representen la Mitjana  $\pm$  SEM. \*  $P < 0.05$  respecte els animals control; #  $P < 0.05$  respecte els grup 21 dies post-immunització.



**Figura 6.** Canvis d'expressió de l'ARNm de les diferents isoformes de PDE4 en leucòcits estimulats *in vitro* amb l'antigen MOG<sub>35-55</sub>. Els resultats mostren els canvis d'expressió respecte a cèl·lules no estimulades a diferents temps (24, 48, 72 i 120 hores) post-estimulació. Els valors representen la Mitjana  $\pm$  SEM.

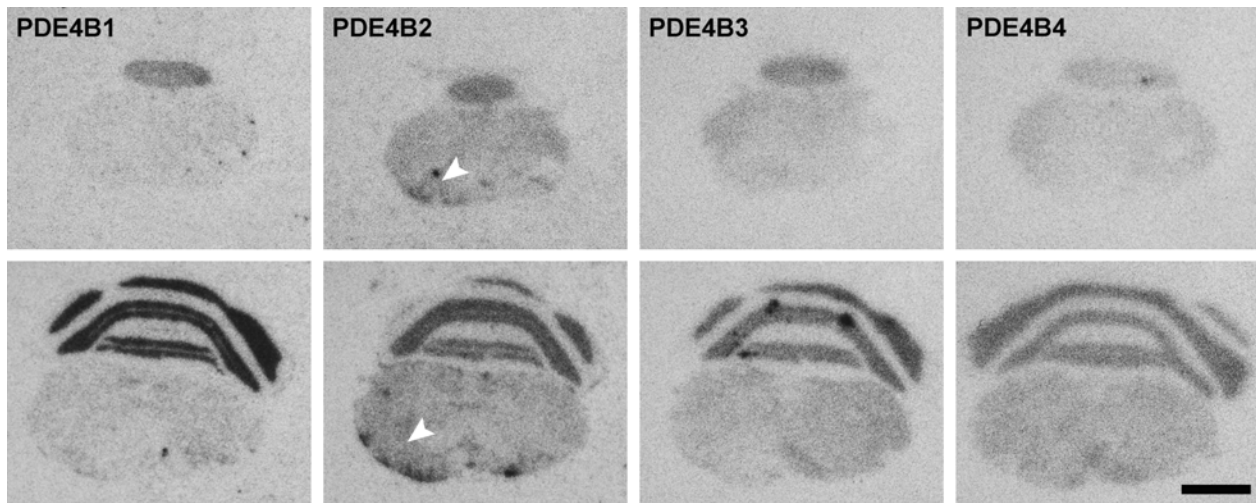
Aquests canvis els vam poder confirmar mitjançant experiments d'hibridació *in situ* per a les diferents isoformes de les PDE4 (PDE4A, PDE4B i PDE4D) en el cervell de ratolins EAE. Els resultats mostren un augment de l'expressió de l'ARNm de PDE4B de forma dispersa en seccions coronals del cervell d'aquests animals (**Figura 7**).



**Figura 7.** Expressió de l'ARNm de la PDE4A, PDE4B i PDE4D en el tronc encefàlic de ratolins EAE 21 p.i. Les imatges macroscòpiques dels films autorradiogràfics mostren la regulació a l'alça de l'ARNm de PDE4B (fletxes) en seccions coronals de SNC en animals EAE. Barra = 2mm.

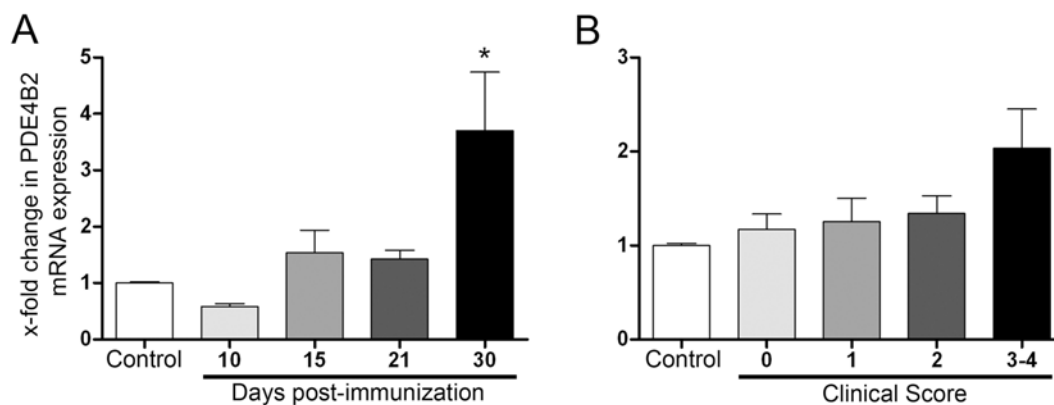
Per tal de determinar quina de les variants d'*splicing* de PDE4B era responsable d'aquest augment, es van realitzar experiments d'hibridació *in situ* per a PDE4B1, PDE4B2, PDE4B3 i PDE4B4 en els animals EAE (**Figura 8**). Els autorradiogrames mostren que tan

sols l'ARNm la variant d'*splicing* PDE4B2 mostrava un patró d'expressió que coincidia amb l'observat e per a PDE4B.



**Figura 8.** Expressió de l'ARNm de la PDE4B1, PDE4B2, PDE4B3 i PDE4B4 en el tronc encefàlic de ratolins EAE 21 p.i. Les imatges macroscòpiques dels films autorradiogràfics mostren la regulació a l'alça de l'ARNm de PDE4B2 (fletxes) en seccions coronals de SNC en animals EAE. Barra = 2mm.

Basant-nos en els resultats de RT-PCR en medul·la espinal i hibridació *in situ* en cervell de ratolins EAE *wildtype* i en treballs anteriors realitzats en rata al nostre laboratori (Reyes-Irisarri...), vam decidir estudiar si aquests canvis observats en l'isoforma PDE4B eren deguts a la regulació a l'alça d'una de les seves variants d'*splicing*, la PDE4B2. Els resultats obtinguts per RT-PCR mostren un augment significatiu, respecte els animals control, de l'expressió de l'ARNm de PDE4B2 en seccions medul·lars de ratolins EAE 30 dies p.i. (**Figura 9A**). Aquest augment també sembla produir-se de forma dependent de la puntuació clínica (**Figura 9B**), ja que s'observa una tendència a la sobreexpressió d'aquest ARNm en els ratolins EAE amb una simptomatologia clínica més severa (*Clinical Score* = 3-4).

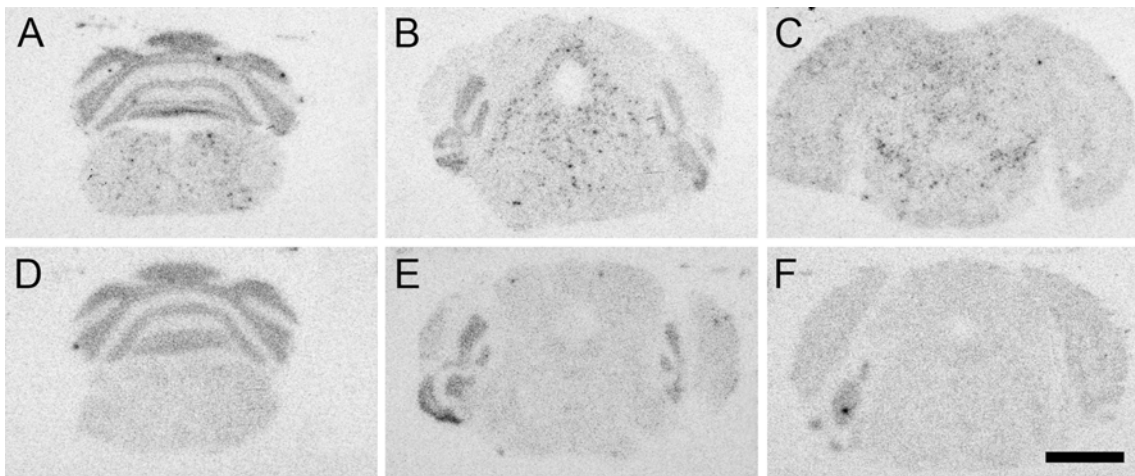




## Resultats

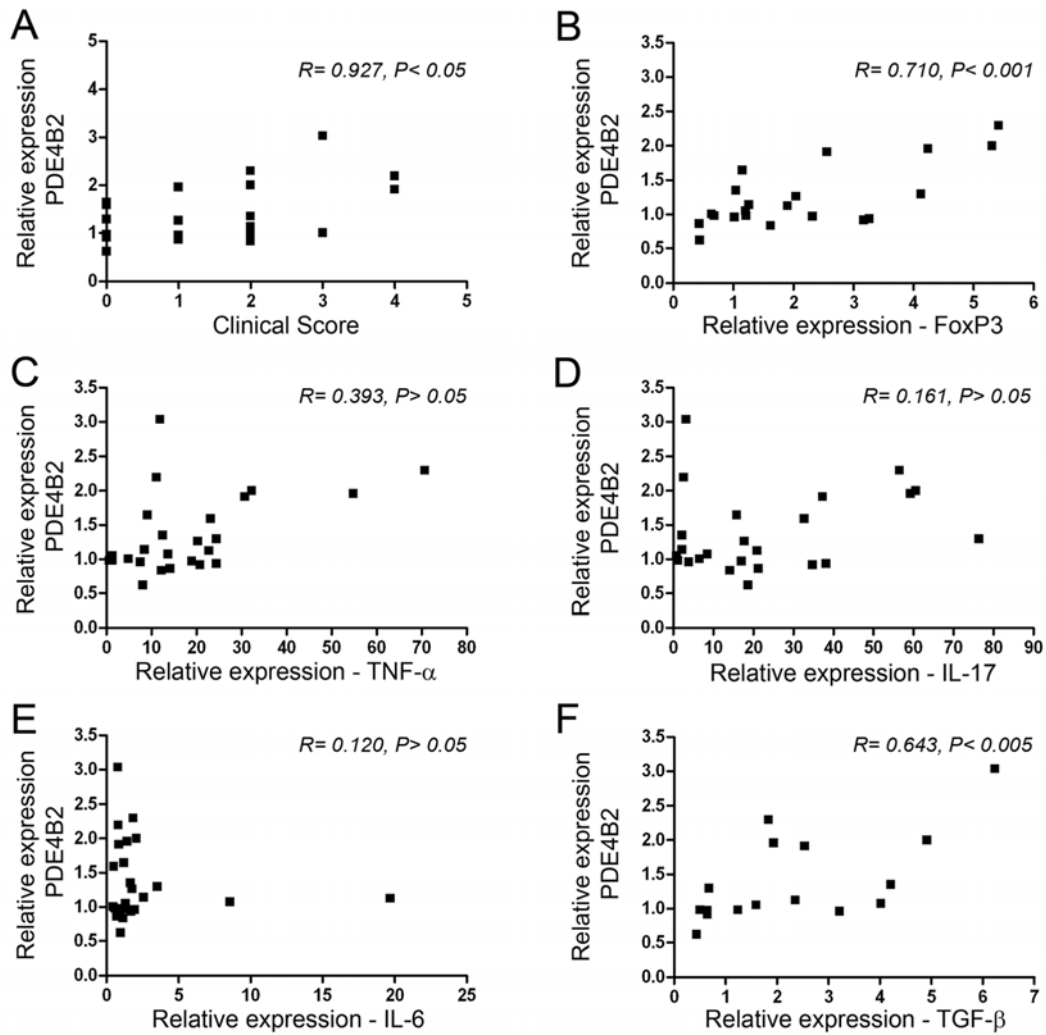
**Figura 9.** Canvis d'expressió de l'ARNm de PDE4B2 en medul·la espinal de ratolins EAE *wildtype* (A) segons els dies post-immunització o (B) segons la puntuació clínica de l'animal als 21 dies post-immunització. Les barres representen la Mitjana  $\pm$  SEM, \*  $P < 0.05$ .

Per tal de corroborar aquests resultats a nivell histològic, vam detectar l'expressió de l'ARNm de PDE4B2 en diverses seccions coronals de la regió del tronc encefàlic de ratolins EAE 30 dies p.i. i animals control mitjançant la tècnica d'hibridació *in situ* radioactiva (Figura 10). Els resultats mostren una regulació a l'alça d'aquest ARNm en forma de clapes de color negre formades pel revelat de la senyal autorradiogràfica a diferents nivells de la regió del tronc encefàlic (Figura 10A-C) dels animals EAE, mentre que no s'observen canvis en la senyal d'hibridació en els animals control (Figura 10D-F).



**Figura 10.** Expressió de l'ARNm de la PDE4B2 en el tronc encefàlic de ratolins EAE 30 p.i. (A-C) respecte a ratolins control (D-F). Les imatges macroscòpiques dels films autorradiogràfics mostren la regulació a l'alça d'aquest ARNm en seccions coronals de SNC en animals EAE i no en animals control. Cal destacar el patró d'expressió dispers que mostra la PDE4B2. Barra = 2mm.

Els anàlisis de correlació ens van mostrar una correlació significativa (correlació de Pearson,  $R = 0.927$ ;  $P < 0.05$ ) entre els nivells d'expressió de l'ARNm de PDE4B2 i la severitat de la malaltia en ratolins amb diverses puntuacions clíniques analitzats en el pic simptomàtic del model EAE (Figura 11A). Al comparar els nivells d'expressió de PDE4B2 i algunes de les citocines i marcadors de resposta immune analitzats, tan sols vam poder detectar correlacions significatives (correlació de Pearson) entre PDE4B2 i l'ARNm del factor de transcripció FoxP3 ( $R = 0.71$ ;  $P < 0.001$ ) (Figura 11B) i la citocina antiinflamatòria TGF- $\beta$  ( $R = 0.64$ ;  $P < 0.005$ ) (Figura 11F).

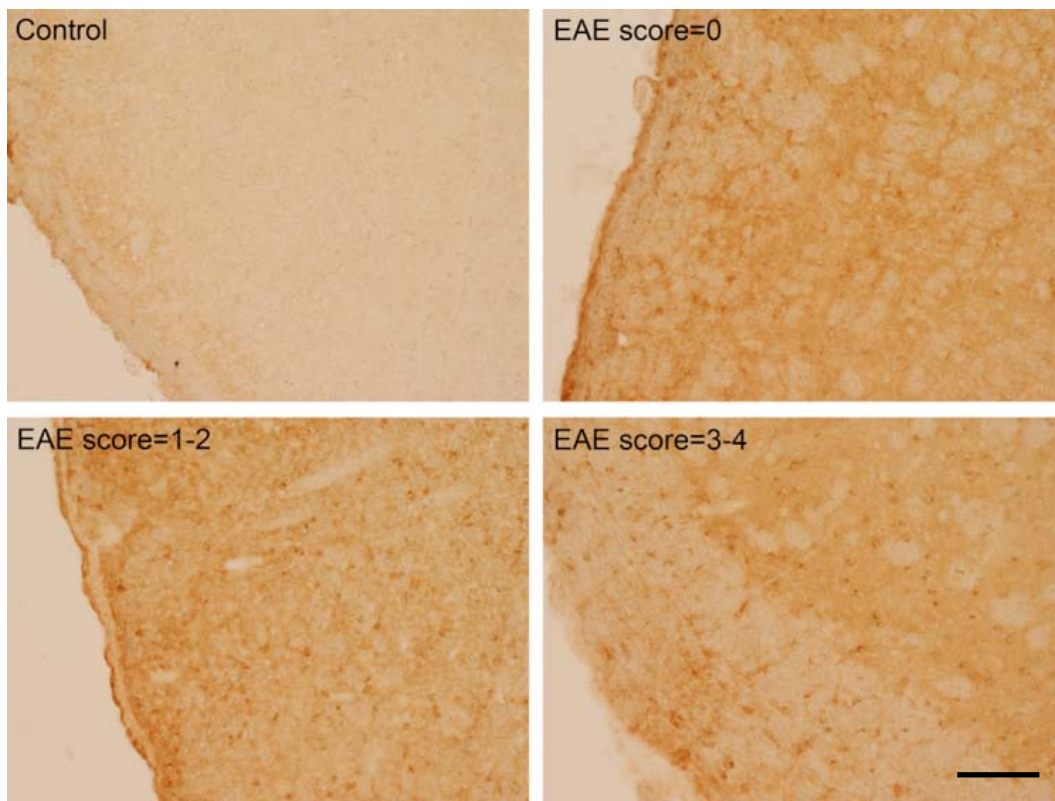


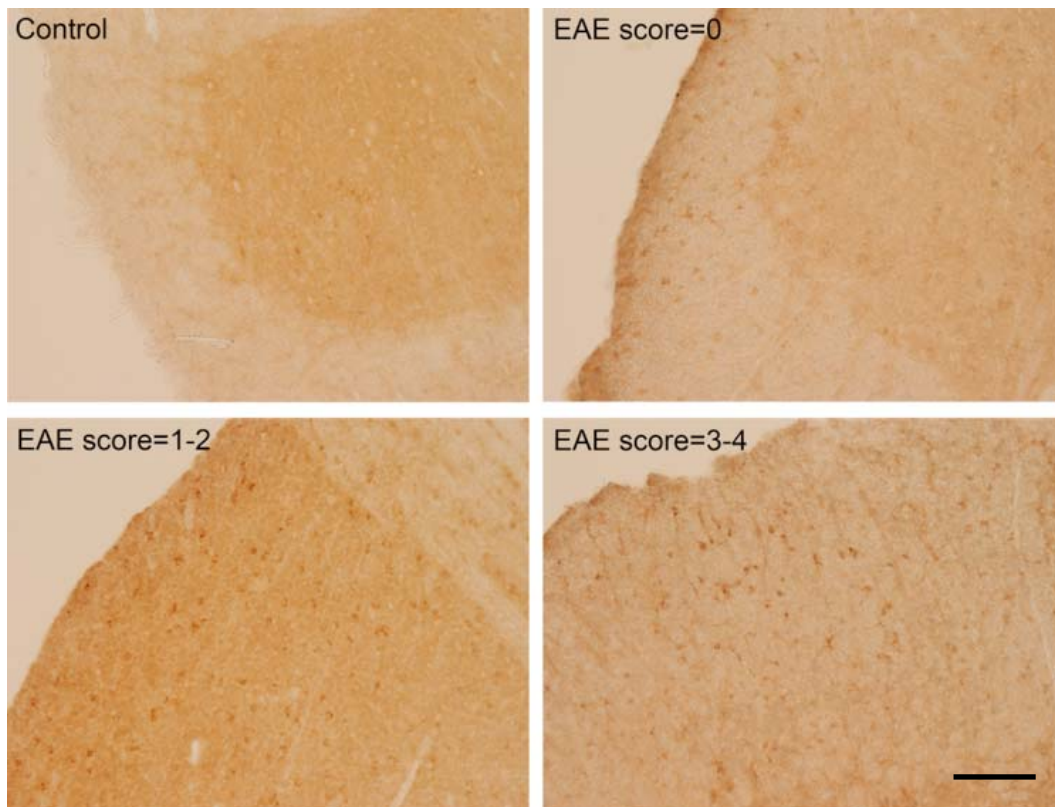
**Figura 11.** Correlació entre la simptomatologia clínica i l'expressió de PDE4B2 i entre l'expressió d'alguns marcadors inflamatoris i PDE4B2 en ratolins EAE. L'anàlisi de correlació es va dur a terme mitjançant el mètode de Pearson i s'observa als gràfics de la següent manera: **(A)** símptomes clínics ( $R = 0.927$ ;  $P < 0.05$ ); **(B)** TNF- $\alpha$  ( $R = 0.393$ ;  $P > 0.05$ ); **(C)** IL-17 ( $R = 0.161$ ;  $P > 0.05$ ); **(D)** FoxP3 ( $R = 0.71$ ;  $P < 0.001$ ); **(E)** IL-6 ( $R = 0.12$ ;  $P > 0.05$ ); **(F)** TGF- $\beta$  ( $R = 0.643$ ;  $P < 0.005$ ). Cada punt a la gràfica representa un animal.  $R$ : coeficient de correlació.



### 3. Canvis en l'expressió de la proteïna PDE4B en el model EAE en ratolins *wildtype*

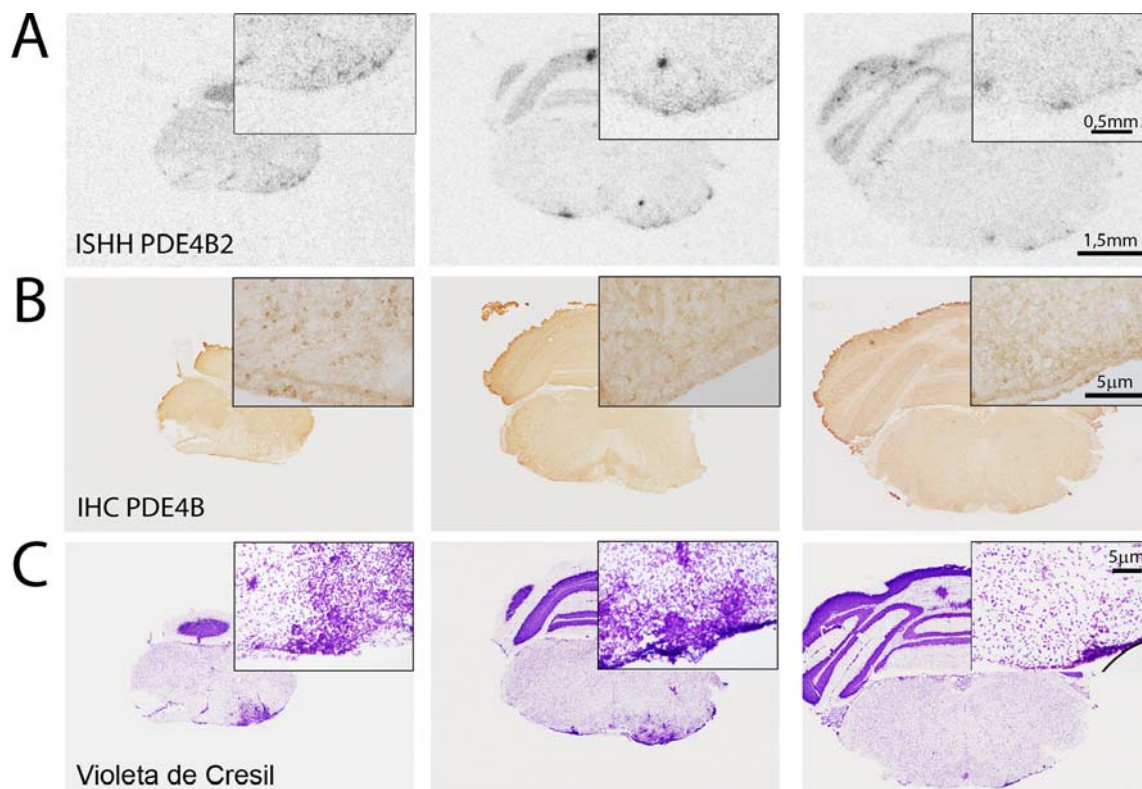
Un cop observada aquesta sobreexpressió de l'enzim PDE4B en els ratolins EAE, i concretament la seva variant d'*splicing* PDE4B2, vam voler analitzar si aquests canvis es produïen també a nivell de proteïna. Amb aquesta finalitat, vam realitzar experiments d'immunohistoquímica (IHC) en seccions coronals de medul·la espinal i cervell de ratolins EAE amb diferents puntuacions clíniques. La falta d'anticossos específics per les variants d'*splicing* de PDE4B va limitar el nostre estudi a aquesta isoforma. Els resultats van mostrar la presència de cèl·lules positives per PDE4B tant en cervell (**Figura 12**) com en medul·la espinal (**Figura 13**) de ratolins EAE que no eren presents en els animals control.





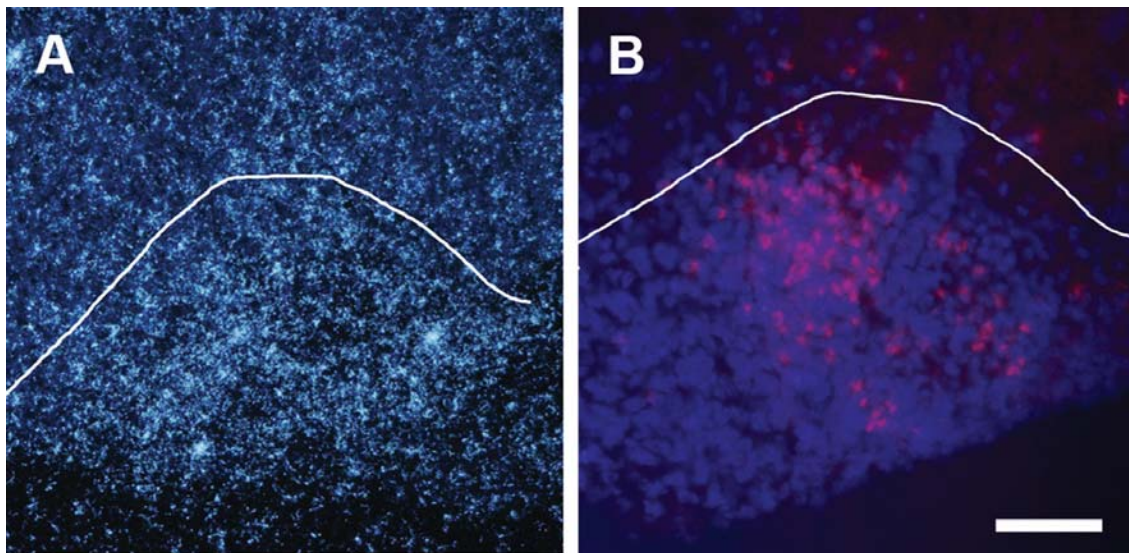
**Figures 12 i 13.** Immunohistoquímica contra PDE4B en cervell (**Figura 12**) i medul·la espinal (**Figura 13**) de ratolins EAE a 21 dies post-immunització. S'observa la presència de cèl·lules PDE4B<sup>+</sup> en animals EAE, però no en els ratolins control. Barra = 5µm.

Comparant aquests resultats d'IHC amb les seccions dels autorradiogrames on es marcava l'ARNm de PDE4B2 amb sondes radioactives vam poder comprovar que coincidien els dos marcatges i que, a la vegada, colocalitzaven amb zones d'infiltració cel·lular detectades mitjançant la tinció de Violeta de Cressyl (**Figura 14**). Per tant, aquest augment d'expressió de l'ARNm de la variant d'*splicing* PDE4B2 també succeeix a nivell de la proteïna PDE4B en ratolins EAE.



**Figura 14.** Comparació de diverses seccions coronals de cervell de ratolí EAE 21 dies post-immunització en (A) hibridació *in situ* radioactiva (ISHH) de l'ARNm de PDE4B2, (B) immunohistoquímica (IHC) de PDE4B i (C) tinció de Violeta de Cresil. Les imatges mostren que la sobreexpressió de l'ARNm de PDE4B2 i l'enzim PDE4B coincideix amb zones d'infiltració cel·lular (marcatge amb Cresil).

Aquests primers experiments de canvis d'expressió de la proteïna PDE4B es van realitzar amb un anticòs proporcionat pel Dr. James A. Cherry (Boston University, Boston, MA 02215, USA) revelat amb 3,3'-Diaminobenzidine (DAB). Els experiments amb immunofluorescència van ser realitzats amb un anticòs contra PDE4B comercial (FabGennix Inc., Frisco, TX, USA).



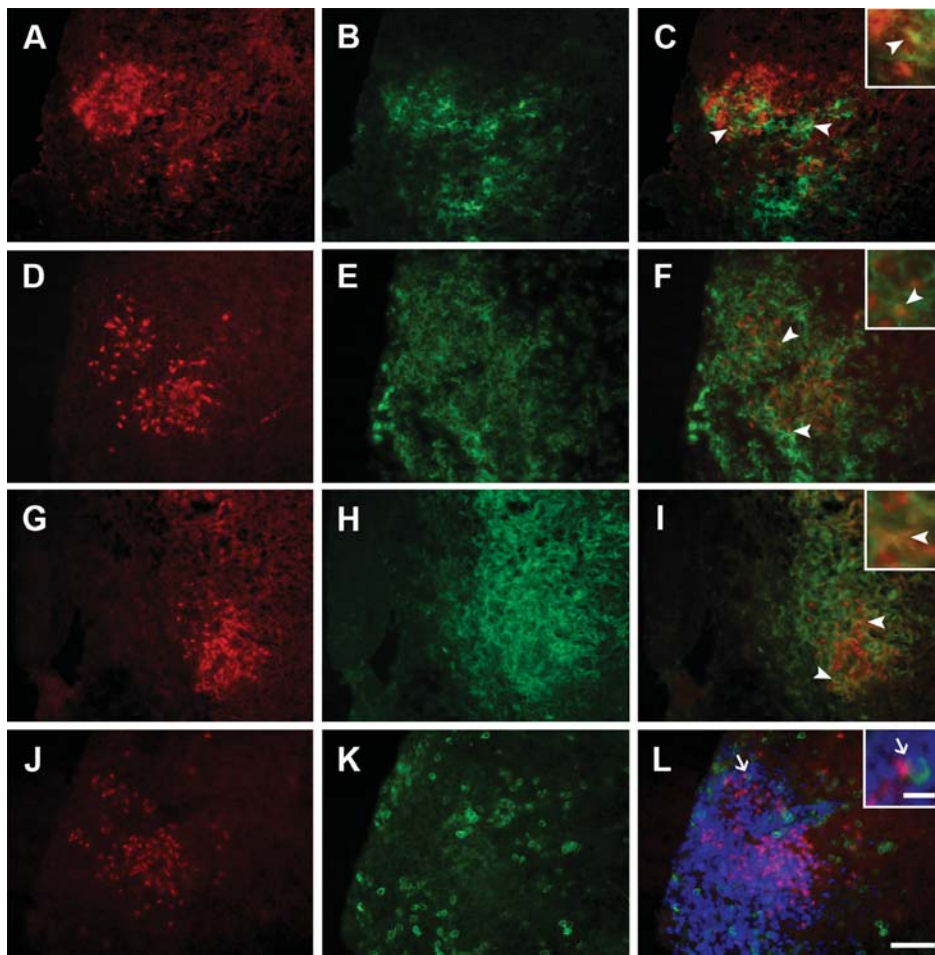
**Figura 15.** Expressió de PDE4B en medul·la espinal d'un ratolí EAE 30 dies post-immunització. (A) Augment d'una microfotografia feta en camp fosc d'una secció incubada amb emulsió fotogràfica on es mostra el patró de sobreexpressió de l'ARNm de PDE4B2 visualitzat mitjançant hibridació *in situ* radioactiva (agrupaments de grans de plata). (B) Immunohistoquímica de cèl·lules PDE4B<sup>+</sup> (vermell) que s'observen en àrees amb una gran infiltració de cèl·lules, detectades aquí mitjançant la tinció de DAPI (blau). Les línies delimiten aquesta zona d'infiltració. Barra = 50µm.

Igual que en els resultats mostrats anteriorment, vam poder detectar la presència d'aquesta proteïna en seccions coronals de medul·la espinal de ratolins EAE (**Figura 15B**) que coincidien amb la sobreexpressió de l'ARNm de PDE4B2 (**Figura 15A**) i àrees d'infiltració cel·lular (**Figura 15B**). En general aquestes àrees es troben situades a prop de les meninges, l'aqüeducte, les parets del quart ventricle i els microvasos sanguinis.



#### 4. Identificació dels tipus cel·lulars que sobreexpressen l'isoforma PDE4B en el model EAE en ratolins *wildtype*

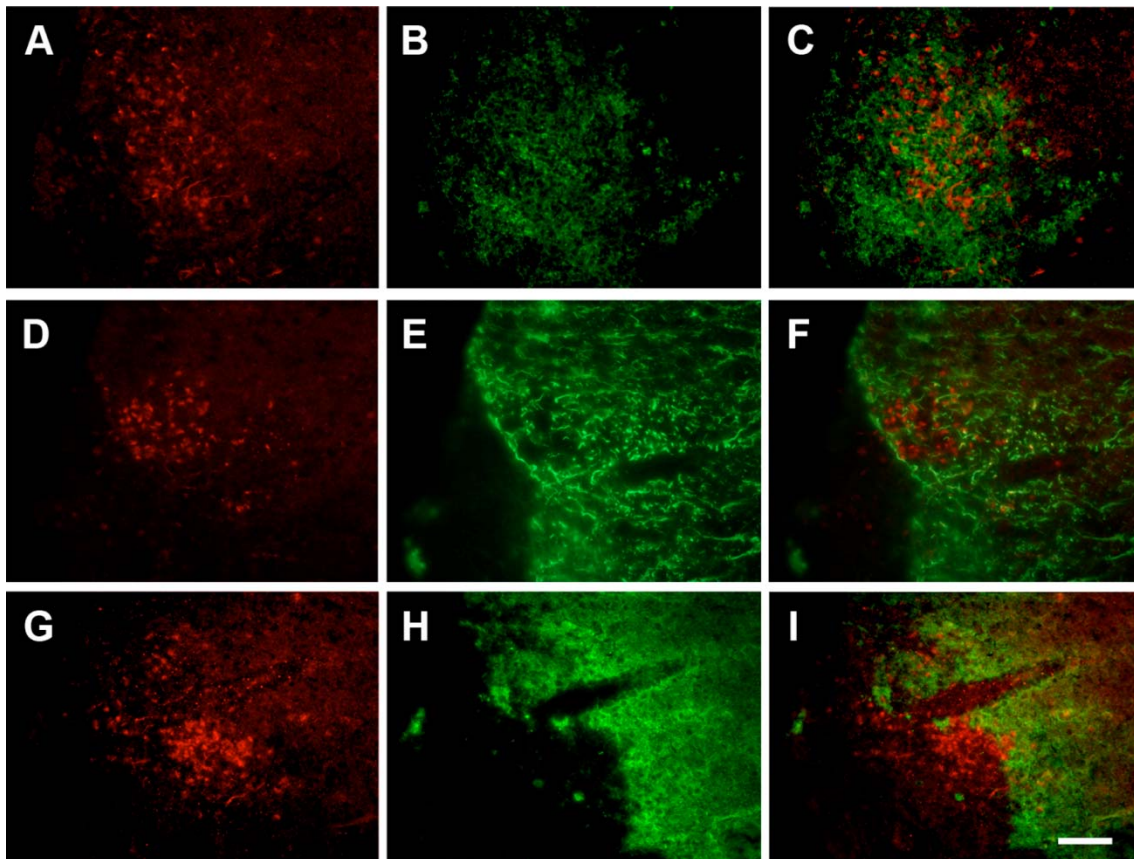
Un cop detectat el canvi d'expressió a nivell de la proteïna PDE4B en els animals EAE, el següent objectiu va ser determinar en quins tipus de cèl·lules es produïa l'expressió d'aquesta isoforma. Per això es van realitzar immunofluorescències dobles en seccions de medul·la espinal de ratolins EAE per a PDE4B i diversos anticossos contra macròfags/micròglia (cèl·lules CD11b<sup>+</sup> i Iba1<sup>+</sup>), oligodendròcits (cèl·lules MBP<sup>+</sup>), astròcits (cèl·lules GFAP<sup>+</sup>), cèl·lules T (cèl·lules CD3<sup>+</sup>), neutròfils i cèl·lules dendrítiques (cèl·lules CD11c<sup>+</sup>). Vam poder observar que tant macròfags/micròglia com cèl·lules dendrítiques expressaven la proteïna PDE4B (**Figura 16A-I**).



**Figura 16.** Immunohistoquímica per a cèl·lules presentadores d'antigen en talls consecutius de medul·la espinal de ratolins EAE 30 dies post-immunització. Doble immunofluorescència de cèl·lules PDE4B<sup>+</sup> (vermell) i (**A-C**) cèl·lules dendrítiques CD11c<sup>+</sup> (verd), (**D-F**) macròfags/micròglia CD11b<sup>+</sup> (verd), (**G-I**) macròfags/micròglia Iba1<sup>+</sup> (verd), i (**J-L**) cèl·lules T CD3<sup>+</sup> (verd) i nuclis cel·lulars DAPI<sup>+</sup> (blau). El quadre d'augment a **L** mostra l'estructura tipus sinapsi que formen les cèl·lules CD3<sup>+</sup> i les PDE4B<sup>+</sup>. Cal destacar la polarització de PDE4B cap a la zona de contacte entre ambdues cèl·lules (fletxa). Les puntes de fletxa senyalen les cèl·lules on colocalitzen les dues proteïnes marcades. Barres = 50 i 10µm.

Sorprenentment, no vam detectar colocalització entre cèl·lules T i cèl·lules PDE4B<sup>+</sup> (**Figura 16J-L**), tot i que vam poder observar la polarització de PDE4B en la zona de contacte entre ambdues cèl·lules (**Figura 16L**) o sinapsis immunològica.

No es va observar expressió de PDE4B en astròcits reactius o neutròfils infiltrats en ratolins EAE (**Figura 17A-F**). Els oligodendròcits es mostraren clarament absents en les àrees amb una abundant infiltració cel·lular, indicant desmielinització (**Figura 17G-I**).



**Figura 17.** Immunohistoquímica per a neutròfils i cèl·lules glials en talls consecutius de medul·la espinal de ratolins EAE 30 dies post-immunització. Doble immunofluorescència de cèl·lules PDE4B<sup>+</sup> (vermell) i (**A-C**) neutròfils (verd), (**D-F**) astròcits GFAP<sup>+</sup> (verd) i (**G-I**) oligodendròcits MBP<sup>+</sup> (verd). Barra = 50µm.

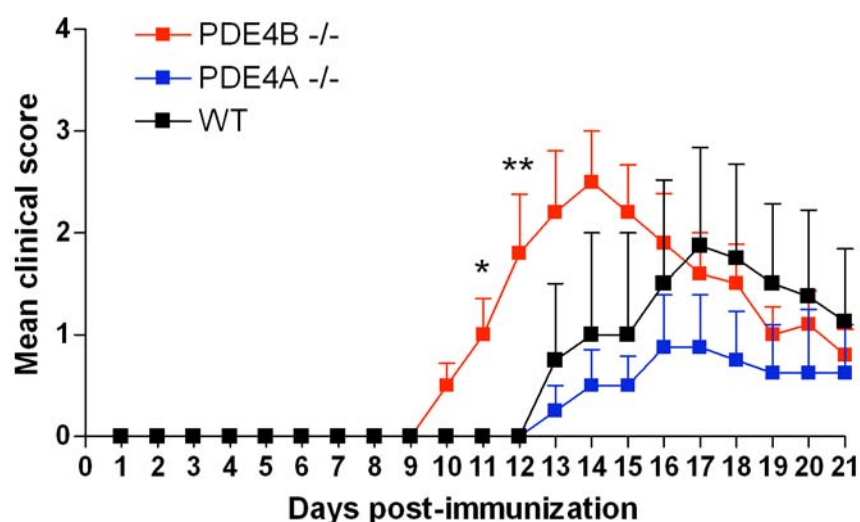
## 5. Estudi del model EAE en ratolins *knockout* per a PDE4A i PDE4B

Una estància al laboratori del Dr. Marco Conti a la University of California San Francisco ens va donar la oportunitat d'avaluar el model EAE en ratolins *knockout* de PDE4, concretament de PDE4A i PDE4B. L'objectiu era analitzar tant la simptomatologia clínica com els canvis histopatològics i la resposta neuroinflamatòria en aquests animals per tal de poder entendre una mica millor el paper d'aquests enzims durant el desenvolupament de la malaltia.

Tot i el nombre reduït d'animals dels que vam poder disposar, els resultats mostren un inici avançat de la malaltia en el grup de ratolins PDE4B<sup>-/-</sup> (Taula 2), així com una tendència a menys severitat simptomatològica en els animals PDE4A<sup>-/-</sup> (Figura 16) en comparació amb el grup *wildtype* (*wt*).

**Taula 2.** Incidència, dia d'inici dels símptomes i mortalitat durant el transcurs de l'EAE en els ratolins PDE4A<sup>-/-</sup>, PDE4B<sup>-/-</sup> i *wildtype* (*wt*) utilitzats.

	Incidència	Dia d'inici	Mortalitat
PDE4A <sup>-/-</sup> (n=4)	3/4 (75 %)	16 ± 4	0/4
PDE4B <sup>-/-</sup> (n=5)	4/5 (80 %)	10 ± 0.5	0/5
<i>wt</i> (n=4)	3/4 (75 %)	15 ± 2	0/4

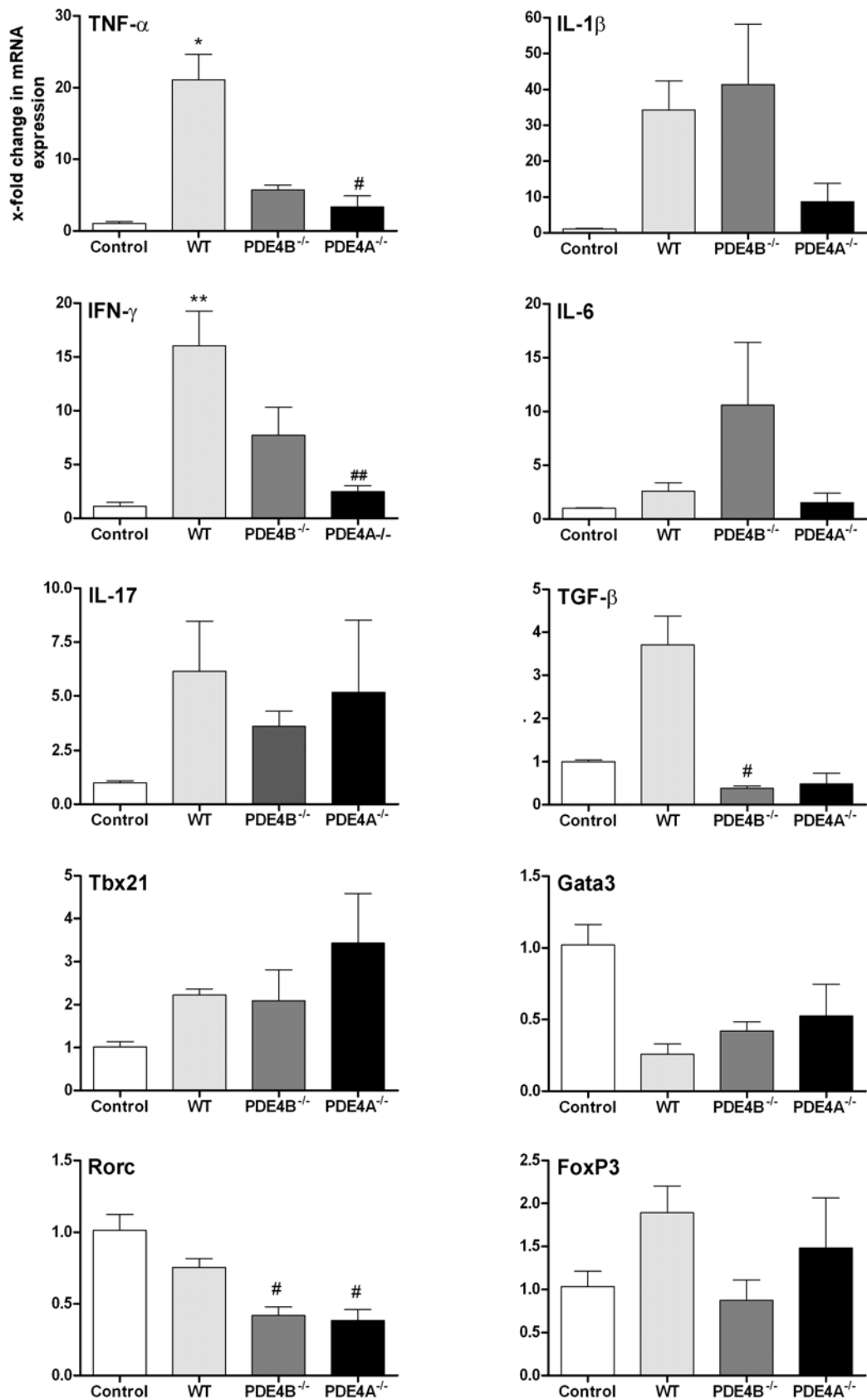


**Figura 18.** Evolució dels símptomes clínics en el model EAE en ratolins PDE4A<sup>-/-</sup>, PDE4B<sup>-/-</sup> i *wildtype* (WT). Els valors representen la Mitjana ± SEM dels tres grups experimentals analitzats, \*  $P < 0.05$  i \*\*  $P < 0.005$ .

Els animals PDE4B<sup>-/-</sup> comencen a mostrar dèficits neurològics al voltant del dia 10 p.i., arriben a un pic el dia 14 i a partir de llavors sembla que hi ha una tendència a la remissió de la simptomatologia fins el dia 21. En el cas dels ratolins PDE4A<sup>-/-</sup>, l'inici dels símptomes es produeix com en els *wt*, però mostren una puntuació clínica al voltant de 1 que es manté durant el transcurs de la malaltia.

Per tal d'avaluar la resposta neuroimmunitària en aquests animals, i comparar-la entre els ratolins *wt* i els *knockout*, es van realitzar anàlisis d'expressió per RT-PCR de diversos marcadors inflamatoris i de sistema immune en la regió cervical de la medulla espinal en animals EAE 21 dies post-immunització. Es van determinar els nivells d'expressió de citocines proinflamatòries (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-17) i antiinflamatòries (TGF- $\beta$ ), i factors de transcripció característics de les diverses subpoblacions de cèl·lules T implicades en el model d'EAE com Th1 (Tbx 21), Th2 (Gata 3), Th17 (Rorc) i T-regs (FoxP3) (**Figura 19**). Els resultats mostren una disminució significativa en els nivells d'expressió d'alguns d'aquests marcadors (TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ ) en els animals *knockout* respecte el grup *wt*. No obstant, també s'observa una tendència a canvis d'expressió per altres marcadors com: disminució dels nivells de FoxP3 en ratolins EAE PDE4B<sup>-/-</sup>; reducció de l'expressió d'IL-1 $\beta$  en el grup PDE4A<sup>-/-</sup>; i sobreexpressió de l'ARNm d'IL-6 en el grup d'animals PDE4B<sup>-/-</sup>. No s'observen canvis en els nivells d'expressió dels factors de transcripció característics de les poblacions de cèl·lules T efectores entre els tres grups d'animals induïts amb EAE.

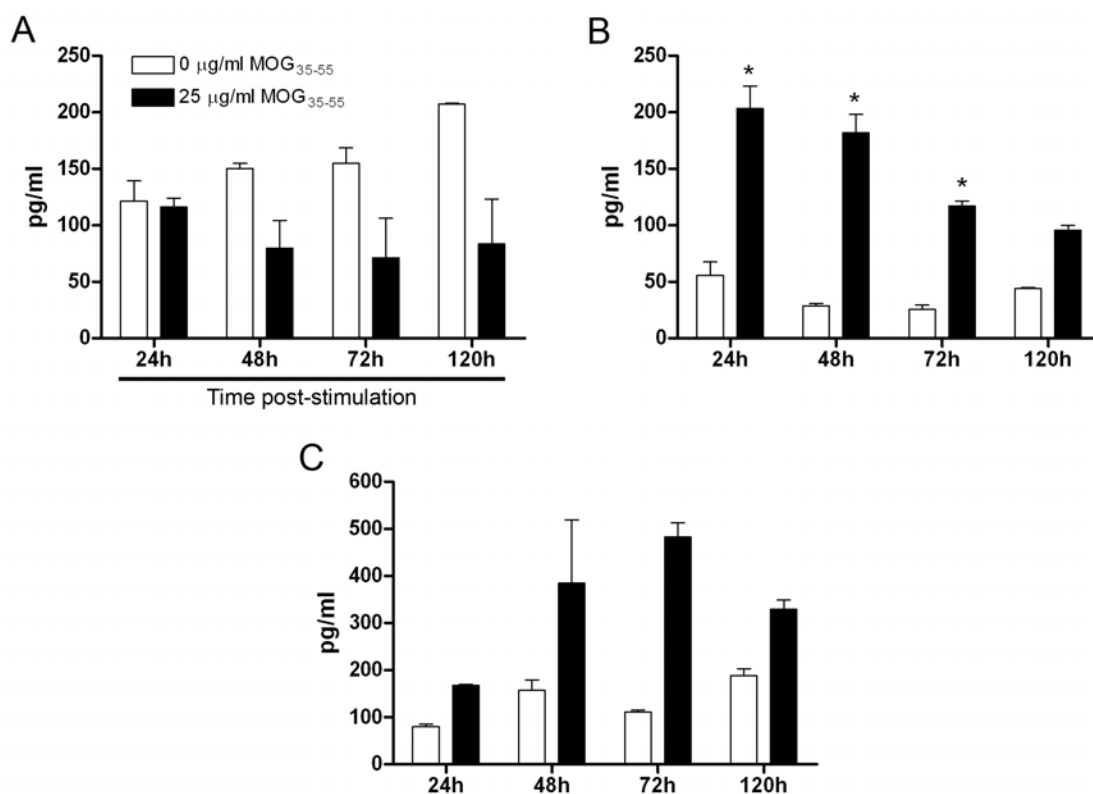




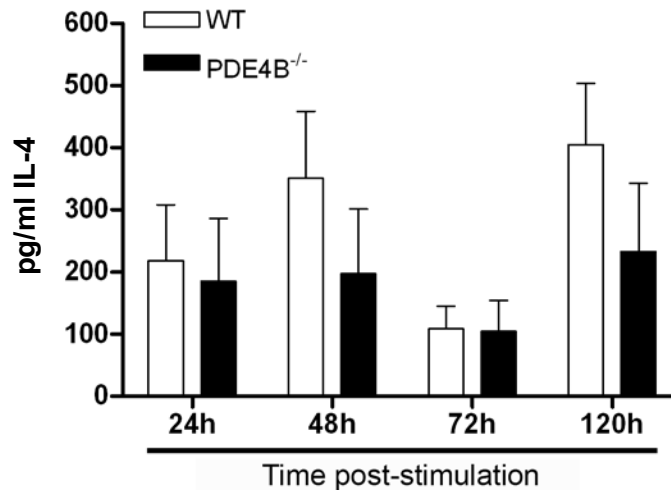
**Figura 19.** Canvis d'expressió de l'ARNm de diversos marcadors de resposta immune en medul·la espinal de ratolins EAE *wildtype* (WT), PDE4B<sup>-/-</sup> i PDE4A<sup>-/-</sup> 21 dies post-immunització. Les barres representen la Mitjana  $\pm$  SEM. \*  $P < 0.05$  i \*\*  $P < 0.01$  respecte el grup control; #  $P < 0.05$  i ##  $P < 0.01$  respecte el grup WT.

Per tal de confirmar els resultats obtinguts per RT-PCR, vam realitzar experiments amb limfòcits de la melsa aïllats d'animals EAE *wt* i *knockout* i estimulats amb l'antigen de mielina. Seguidament es va recollir el sobrenadant d'aquestes cèl·lules a diferents temps post-estimulació per analitzar-lo mitjançant la tècnica d'ELISA. En aquest sobrenadant es recullen i detecten les citocines alliberades per les cèl·lules un cop estimulades amb el seu antigen específic.

El primer va ser comprovar resultats previs obtinguts amb macròfags i monòcits de ratolins *wt* i *knockout* per PDE4B estimulats *in vitro* amb LPS, on no s'observava producció de TNF- $\alpha$  (REF Conti). Els nostres resultats mostren que l'estimulació dels limfòcits de ratolins EAE PDE4B<sup>-/-</sup> no produeix canvis en l'alliberació de TNF- $\alpha$  (**Figura 20A**), mentre que sí que es produeix un augment en la producció d'aquesta citocina en animals PDE4A<sup>-/-</sup> (**Figura 20B**) i animals *wt* (**Figura 20C**).



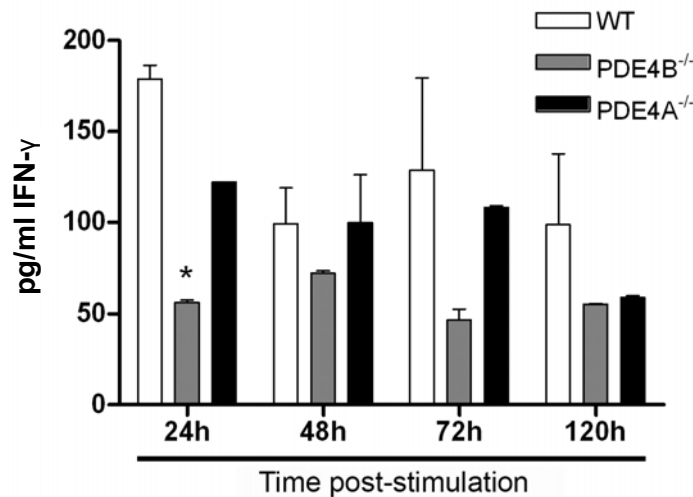
**Figura 20.** Producció de TNF- $\alpha$  en limfòcits de ratolins EAE *wt* i *knockout* post-estimulació amb l'antigen de mielina. Els limfòcits aïllats de ratolins EAE 21 dies post-immunització (A) PDE4B<sup>-/-</sup>, (B) PDE4A<sup>-/-</sup> i (C) *wildtype* foren estimulats o no amb MOG<sub>35-55</sub> i els seus sobrenadants analitzats per ELISA contra la citocina TNF- $\alpha$  a diversos temps post-estimulació. \*  $P < 0.05$  respecte els limfòcits no estimulats.



**Figura 21.** Producció d'IL-4 en limfòcits de ratolins EAE *wt* i *knockout* post-estimulació amb l'antigen de mielina. Els limfòcits aïllats de ratolins EAE 21 dies post-immunització PDE4B<sup>-/-</sup> i *wildtype* foren estimulats amb MOG<sub>35-55</sub> i els seus sobrenadants analitzats per ELISA contra la citocina IL-4 a diversos temps post-estimulació.

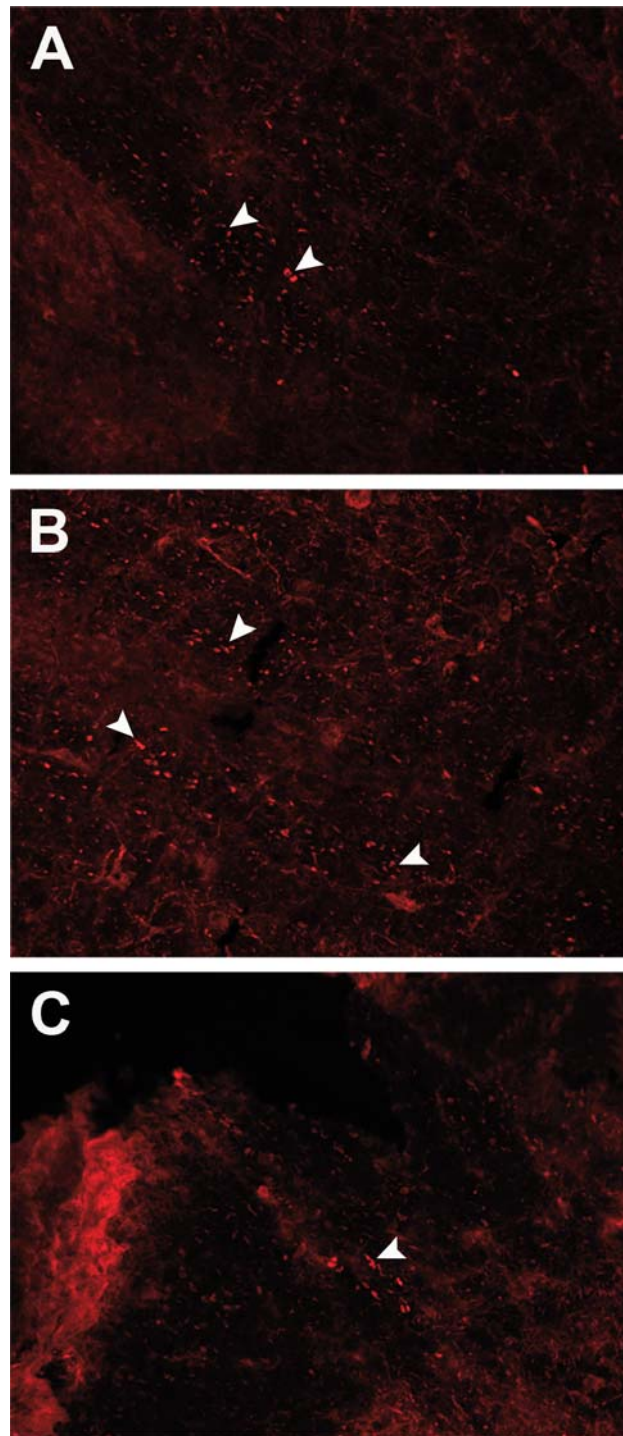
També es van comparar els nivells de producció d'IL-4 entre els limfòcits estimulats d'animals EAE *wt* i PDE4B<sup>-/-</sup>, per comprovar si es produïa una polarització de la resposta de cèl·lules T cap a Th2. Els resultats mostren que no existeixen canvis en la producció d'aquesta citocina entre els dos grups experimentals (**Figura 21**).

Finalment, es va intentar corroborar els resultats significatius obtinguts per l'ARNm d'IFN- $\gamma$  a nivell de síntesis de proteïna. Es van analitzar els sobrenadants de limfòcits estimulats amb MOG<sub>35-55</sub> en els tres grups d'animals EAE: *wt*, PDE4B<sup>-/-</sup> i PDE4A<sup>-/-</sup>. Els resultats mostren que els dos grups d'animals *knockout* alliberen menys IFN- $\gamma$  al medi extracel·lular després de l'estimulació amb l'antigen de mielina (**Figura 22**). S'observa una disminució significativa dels nivells d'IFN- $\gamma$  en limfòcits PDE4B<sup>-/-</sup> tan sols 24h post-estimulació, tot i que es detecta una tendència a aquesta disminució pels limfòcits PDE4B<sup>-/-</sup> respecte els *wt* a 48, 72 i 120h post-estimulació amb MOG<sub>35-55</sub>, i també en limfòcits PDE4A<sup>-/-</sup> a 120h post-estimulació.



**Figura 22.** Producció d'IFN- $\gamma$  en limfòcits de ratolins EAE *wildtype* (WT) i *knockout* post-estimulació amb l'antigen de mielina. Els limfòcits aïllats de ratolins EAE 21 dies post-immunització PDE4B<sup>-/-</sup>, PDE4A<sup>-/-</sup> i WT foren estimulats amb MOG<sub>35-55</sub> i els seus sobrenadants analitzats per ELISA contra la citocina IFN- $\gamma$  a diversos temps post-estimulació. . \*  $P < 0.05$  respecte els limfòcits estimulats dels animals WT.

Els resultats obtinguts per immunohistoquímica no van revelar diferències histopatològiques importants entre els tres grups experimentals. L'activació microglial es mantenia en zones perivasculars i en els òrgans circumventriculars d'aquests animals transgènics amb EAE, i no vam observar diferències entre el nombre de limfòcits infiltrats. Cal destacar però que la detecció del dany axonal mitjançant el marcador SMI32 va mostrar un marcatge més extens per el grup PDE4B<sup>-/-</sup> (**Figura 23B**) respecte els animals *wildtype* (**Figura 23A**), mentre que en els ratolins PDE4A<sup>-/-</sup> el vam trobar localitzat de forma més restringida (**Figura 23C**).



**Figura 23.** Immunohistoquímica per a la detecció del dany axonal en ratolins EAE 21 dies post-immunització *wildtype* (A), *PDE4B<sup>-/-</sup>* (B) i *PDE4A<sup>-/-</sup>* (C). La presència de dany axonal es detecta pel marcatge de SMI32 (vermell). Aquest neurofilament hipofosforil·lat s'acumula als axons de neurones afectades per la desmielinització (fletxes). Barra = 100  $\mu$ m.

***Discussió***

Els resultats obtinguts en aquesta tesi mostren una implicació de les PDEs de la família 4 durant la patologia del model animal d'Esclerosis Múltiple, EAE, concretament la isoforma PDE4B i la seva variant d'*splicing* PDE4B2. El seu paper sembla clau en la regulació dels nivells d'AMPc intracel·lulars en les cèl·lules presentadores d'antigen com macròfags, micròglia i cèl·lules dendrítiques, i modulant d'aquesta manera l'ambient de citocines produït durant la resposta neuroimmune.

### 1.El model d'EAE en ratolins *wildtype*

Degut a la limitada disponibilitat de teixit cerebral de pacients amb EM en fase activa, especialment aquells que es troben en les primeres fases de la malaltia, una gran varietat de models animals s'han desenvolupat per estudiar els mecanismes moleculars de la mort neuronal i la degeneració axonal durant la resposta neuroinflamatòria en aquesta patologia autoimmune del SNC (Wekerle et al. 1994). La progressió de la malaltia, les cèl·lules del sistema immune implicades i el dany tissular difereixen entre les diferents espècies i soques utilitzades, permeten la investigació de diversos aspectes de la patologia que puguin ser extrapolats a la malaltia en humans (Gold et al. 2006).

El model EAE en la soca de ratolins C57BL/6 s'ha utilitzat per estudiar certs aspectes de la neuroinflamació crònica, essent el millor model per l'estudi de la desmielinització mitjançant cèl·lules T i macròfags (Gold et al. 2006). La immunització en aquest model mitjançant MOG indueix un atac sever seguit per una recuperació incompleta i, de forma freqüent, un estadi secundari progressiu de deteriorament clínic permanent, com el que es troba en les fases tardanes de l'EM (Mendel et al. 1995). Aquest procés es produeix també en els nostres grups d'animals EAE, amb un primer atac sever al voltant del dia 14 post-immunització que arriba al seu màxim pel que fa a simptomatologia clínica al voltant dels 21 dies, i es manté de forma progressiva crònica fins al dia 30 en el cas dels nostres experiments.

La presència d'infiltrats cel·lulars i zones de desmielinització, observat en els animals EAE, és freqüent en aquest model animal, sobretot en la medul·la espinal i en estadis primerencs de la malaltia (Vogt et al. 2009). Aquestes lesions inflamatòries s'ha demostrat que són més actives en els animals entre els dies 14 i 21 post-immunització, i que la mida d'aquestes lesions correlaciona amb la puntuació clínica dels animals (Recks et al. 2011). També trobem degeneració axonal (SMI32<sup>+</sup>) i neuronal (FluoroJade B<sup>+</sup>) en aquestes

regions, de forma similar al que s'observa en les lesions desmielinitzants de pacients amb EM (Kornek et al. 2000; Peterson et al. 2001), tot i que en alguns casos la presència de dany axonal es troba en absència de desmielinització (DeLuca et al. 2006).

A part de la desmielinització, la inflamació és crítica pel dany neuronal degut a la capacitat citotòxica de molècules proinflamàtores i cèl·lules efectores que participen en la patologia de l'EM i l'EAE (Ferguson et al. 1997). En el nostre model observem una sobreexpressió de l'ARNm de citocines proinflamàtores com TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$ , citocines secretades majoritàriament per macròfags i micròglia i que promouen la inflamació (Hanisch 2002). El TNF- $\alpha$  es coneix com la citocina més neurotòxica, ja que produeix neurodegeneració per activació de les vies de mort cel·lular i per excitotoxicitat (Venters et al. 2000; Takeuchi et al. 2006). IL-1 $\beta$ , per la seva banda, és una citocina involucrada en la inflamació per cèl·lules Th17 i el dany en el SNC en model EAE induint el reclutament de leucòcits i la producció d'altres citocines proinflamàtores (Furlan et al. 2007). En el cas d'IFN- $\gamma$ , del qual també observem una sobreexpressió en els ratolins EAE, és una citocina implicada en la diferenciació de les cèl·lules Th1 que s'expressa al SNC a l'inici dels símptomes de l'EAE, incrementant molt la seva expressió durant el pic de la malaltia (Renno et al. 1998). També s'observa un augment de l'expressió de l'ARNm de TGF- $\beta$  i el factor de transcripció de les cèl·lules Tregs FoxP3. Aquestes cèl·lules es troben presents durant el desenvolupament de l'EAE, i s'associen amb la protecció i la recuperació d'aquests animals (McGeachy et al. 2005). Es creu que la inducció d'aquestes cèl·lules ve potenciada per la citocina TGF- $\beta$ , responsable de la seva expansió i manteniment (Li et al. 2006). L'observació d'una disminució de l'expressió del factor de transcripció Gata3 (cèl·lules Th2) abans de l'aparició de la malaltia i la recuperació dels nivells control durant la fase progressiva crònica pot afavorir l'aparició de l'EAE, ja que nivells elevats de cèl·lules Th2 s'han relacionat amb la remissió o recuperació en EAE i EM (Duda et al. 2000; Araki et al. 2003; Bai et al. 2009).

## **2.Canvis d'expressió de PDE4 en el model d'EAE**

La implicació de l'AMPc i les seves vies de senyalització durant la resposta neuroinflamatòria és àmpliament acceptada i la possibilitat de manipular els nivells d'AMPc mitjançant inhibidors de PDEs per controlar la inflamació ha despertat un gran interès. La inhibició específica dels enzims de la família de PDE4 produeix efectes antiinflamatoris com la supressió o estimulació de diverses citocines (revisat a (Torphy



1998; Banner and Trevethick 2004) i la inhibició de la secreció de TNF- $\alpha$  per part de monòcits i macròfags (Sommer et al. 1995; Jin and Conti 2002). Molts inhibidors de PDE4 es troben actualment en desenvolupament pel tractament de malalties respiratòries inflamatòries, com l'asma o la malaltia pulmonar obstructiva crònica (MPOC), així com la colitis ulcerosa o malaltia de Crohn. Les probabilitats d'aquests inhibidors per ser efectius es basen en el coneixement actual sobre el paper de PDE4 en suprimir la resposta inflamatòria de cèl·lules implicades en la patologia d'aquestes malalties (Spina 2008; Hatzelmann et al. 2010). A més, el tractament amb l'inhibidor selectiu de PDE4 rolipram d'animals amb EAE a mostrat una millora de la simptomatologia clínica d'aquests (Sommer et al. 1995; Folcik et al. 1999; Moore et al. 2006).

De les quatre isoformes de PDE4, només tres es troben expressades al SNC i al sistema immune: PDE4A, PDE4B i PDE4D. Els resultats mostren un augment de la isoforma PDE4B en la medul·la espinal de ratolins EAE amb símptomes més severes. No obstant, quan estimulem els limfòcits i macròfags aïllats de la melsa d'aquests animals amb l'antigen de MOG s'observa una tendència a la sobreexpressió de PDE4B i PDE4D. Aquestes isoformes són les més implicades en la resposta inflamatòria: sembla que PDE4B i PDE4D tenen un paper clau en l'activació de les cèl·lules T (Baroja et al. 1999; Abrahamsen et al. 2004).

### 3. Expressió de PDE4B en el model d'EAE

En aquest treball ens vam centrar en el paper de PDE4B, i concretament en la seva variant d'*splicing* PDE4B2, degut a resultats previs obtinguts en el laboratori en el model EAE en rates (Reyes-Irisarri et al. 2007). La sobreexpressió de l'ARNm de PDE4B2 va ser detectat al voltant de l'inici de la malaltia, i augmentava de forma significativa en animals amb una EAE progressiva crònica. Aquesta regulació transcripcional a l'alça es va detectar en diverses àrees del SNC, indicant que aquesta sobreexpressió començava a la medul·la espinal en l'inici de l'EAE i que s'anava expandint cap a àrees anteriors del cervell. Aquest patró és comparable al que s'observa pels infiltrats cel·lulars en el SNC de ratolins C57BL6J amb EAE (Brown and Sawchenko 2007), suggerint que potser algunes d'aquestes cèl·lules podrien estar implicades en l'augment d'expressió de l'ARNm de PDE4B2. La correlació observada entre l'ARNm de PDE4B2 i la simptomatologia clínica en aquests animals també recolza aquesta hipòtesis, ja que símptomes clínics més severes s'associen amb un nombre més elevat d'infiltrats cel·lulars (Recks et al. 2011).

Dins dels infiltrats cel·lulars que s'observen en el model EAE, les cèl·lules T són una de les poblacions més abundants. Les poblacions efectores Th1 i Th17 són les que tenen un paper patogènic clau en el model d'EAE (Zamvil and Steinman 1990), mentre que la subpoblació de cèl·lules Tregs FoxP3<sup>+</sup> es troben implicades en la regulació de la resposta immune (Korn et al. 2007). La correlació observada entre l'expressió relativa de l'ARNm del factor de transcripció FoxP3 i PDE4B2 suggereix que en els animals amb EAE té lloc una diferenciació de les cèl·lules T cap a un fenotip FoxP3<sup>+</sup>, i que PDE4B2 podria exercir un paper en aquest procés, possiblement estabilitzant el fenotip funcional d'aquestes Tregs (Gavin et al. 2007). La diferenciació de les cèl·lules T en Tregs o Th17 és dependent de l'ambient de citocines. TGF- $\beta$  i IL-6 són importants per mantenir el balanç entre aquestes dues poblacions cel·lulars (Deshpande et al. 2007; Korn et al. 2007; Fallarino et al. 2010). La correlació observada entre l'ARNm de TGF- $\beta$  i PDE4B2, i l'absència de correlació amb IL-6, donen suport a la hipòtesis que aquest enzim podria tenir un possible paper en la diferenciació de les cèl·lules Tregs.

#### **4. Tipus cel·lulars que expressen PDE4B en model d'EAE**

Els primers resultats per immunohistoquímica de PDE4B mostraven una expressió d'aquest enzim en medul·la espinal i tronc encefàlic de ratolins EAE i no en el grup d'animals control. Aquestes regions coincidien amb aquelles on observàvem una sobreexpressió de l'ARNm de PDE4B2 i també amb zones amb una elevada infiltració cel·lular. Per aquest motiu ens vam qüestionar si les cèl·lules que expressaven PDE4B podien ser cèl·lules del sistema immune o bé cèl·lules residents del SNC activades per la resposta immune.

En el model d'EAE, les cèl·lules presentadores d'antigen (APCs) perifèriques, com les cèl·lules dendrítiques (DCs) i els macròfags associats amb les meninges i els vasos sanguinis del SNC es postula que faciliten la capacitat encefalitogènica de les cèl·lules T, permetent la seva infiltració i l'inici d'una cascada inflamatòria que resultarà en dany tissular (Greter et al. 2005). També cal destacar que les cèl·lules dendrítiques i els macròfags s'infiltrin al SNC, on produiran una reactivació dels limfòcits, juntament amb les APCs residents del SNC, la micròglia (revisat a (Almolda et al. 2011)). Els nivells d'AMPc intracel·lular controlen, entre d'altres vies de senyalització, l'activació o supressió de les APCs i l'ambient de citocines durant la resposta immune (Fassbender et al. 2010; Garay et al. 2010). Aquestes informacions, juntament amb el fet que es va observar una

colocalització entre PDE4B i marcadors cel·lulars per les diverses poblacions d'APCs (cèl·lules dendrítiques, micròglia i macròfags) ens fa pensar en un possible paper d'aquesta isoforma en el procés de presentació de l'antigen regulant els nivells d'AMPc.

Sorprenentment, l'expressió de PDE4B no semblava colocalitzar amb les cèl·lules T infiltrants, contradient resultats prèviament publicats on s'observava una colocalització de l'ARNm de PDE4B2 amb les cèl·lules T en rates amb EAE (Reyes-Irisarri et al. 2007). Això ens indicaria que, encara que sembla que PDE4B podria estar afectant la diferenciació de cèl·lules T, no ho faria a través de mecanismes intracel·lulars intrínsecs a aquestes cèl·lules. No obstant, la polarització observada per la proteïna PDE4B en el punt de contacte entre les cèl·lules T i les cèl·lules PDE4B<sup>+</sup>, recolzaria també la hipòtesis que aquest enzim tingui un paper durant el procés de presentació d'antigen en el parènquima cerebral. Aquest punt de contacte, conegut com a sinapsis immunològica, es manté de forma transitòria durant la presentació de l'antigen per part de l'APC a la cèl·lules T específica i es clau per l'activació i diferenciació d'aquestes cèl·lules (Fooksman et al. 2010). A diferència de resultats previs que demostraven la implicació i expressió de PDE4B en l'activació de les cèl·lules T (Baroja et al. 1999), aquí mostrem que no hi ha presència de PDE4B en les cèl·lules T, sinó en les APCs tant perifèriques com residents del SNC, i que aquest enzim podria tenir un paper important en alguna de les seves funcions.

### **5.El model EAE en ratolins *knockout* per PDE4A i PDE4B**

Com ja s'ha comentat anteriorment, l'administració d'inhibidors selectius de PDE4 en animals EAE produeix una millora de la simptomatologia clínica, així com una reducció de les lesions inflamatòries (Moore et al. 2006). Per tant seria lògic pensar que l'eliminació d'alguna de les isoformes de PDE4 podria tenir efectes beneficiosos en animals als que se'ls indueix EAE.

En base els resultats obtinguts sobre la sobreexpressió de PDE4B observada en ratolins EAE *wildtype*, vam induir l'EAE en ratolins PDE4B<sup>-/-</sup> i vam comparar-los amb ratolins *wildtype* i ratolins que els hi faltés una altra isoforma de PDE4, PDE4A<sup>-/-</sup>. De forma sorprenent, vam poder observar dos fenòmens. Un que els animals EAE PDE4B<sup>-/-</sup> presentaven un inici temprà de la malaltia, en comparació amb el grup *wildtype*, i l'altre que els ratolins PDE4A<sup>-/-</sup> tendien a iniciar els símptomes més tard i que aquests eren

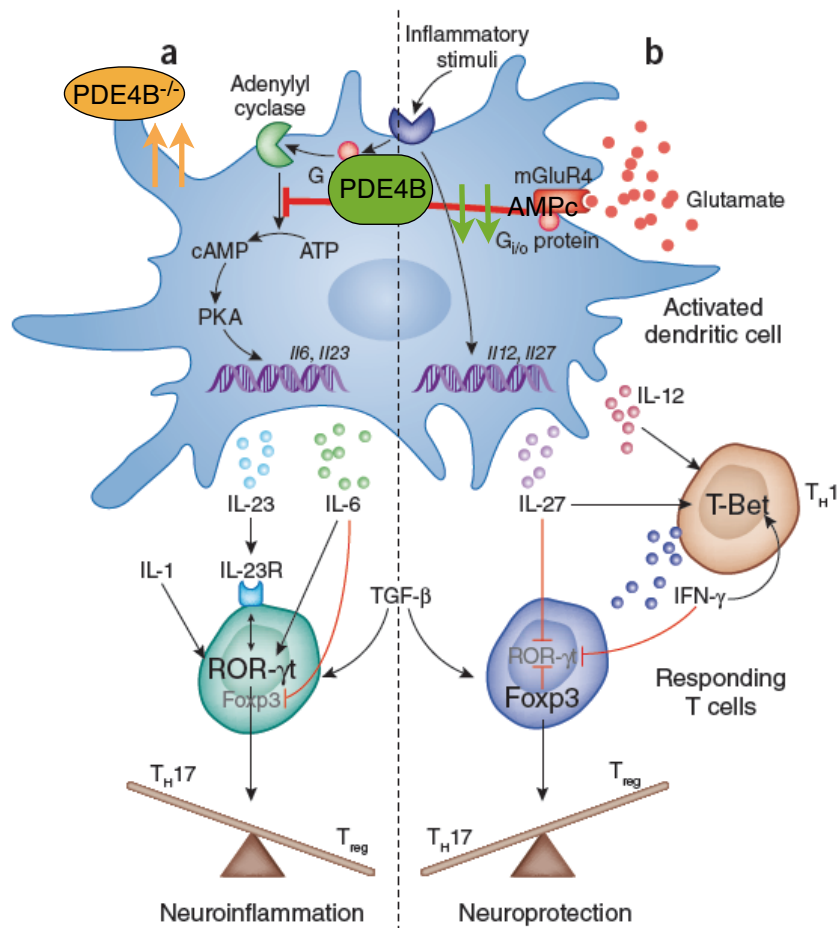
menys severos també en comparació amb el grup *wildtype*. Segons els resultats previs obtinguts en animals EAE *wildtype*, esperàvem una certa protecció envers la inducció de l'EAE en el grup PDE4B<sup>-/-</sup>, i cap diferència entre els animals PDE4A<sup>-/-</sup> i els *wildtype*. L'estimulació per LPS de monòcits i macròfags aïllats de ratolins PDE4B<sup>-/-</sup> no produïa producció de TNF- $\alpha$  (Jin and Conti 2002), essent aquesta una de les citocines amb més activitat proinflamatòria durant la patologia autoimmune (Kuroda and Shimamoto 1991). En el cas dels ratolins PDE4A<sup>-/-</sup>, no mostren grans alteracions en la resposta immune, tan sols menys hiperreactivitat de les vies respiratòries en presència d'al·lèrgens (Ariga et al. 2004).

Centrant-nos en la citocina TNF- $\alpha$ , de gran interès en el desenvolupament del model EAE, vam observar que tant PDE4B<sup>-/-</sup> com PDE4A<sup>-/-</sup> expressaven menys ARNm de TNF- $\alpha$  després de la inducció de l'EAE respecte els animals *wildtype*. Era d'esperar en els PDE4B<sup>-/-</sup>, però en el cas del grup PDE4A<sup>-/-</sup> podria ser degut a la menor severitat dels símptomes, ja que l'expressió de TNF- $\alpha$  correlaciona amb la progressió de l'EAE (Issazadeh et al. 1995). A més, l'estimulació *in vitro* amb MOG dels leucòcits d'aquests animals va mostrar que tan sols en el cas de PDE4B<sup>-/-</sup>, l'estimulació no produïa l'alliberació de TNF- $\alpha$ , mentre que els leucòcits aïllats del grup de ratolins PDE4A<sup>-/-</sup> responien a l'estimulació antigènica i eren capaços de produir TNF- $\alpha$  com a resposta.

Les citocines proinflamatòries IFN- $\gamma$  i IL-1 $\beta$  les trobem sobreexpressades en el model animal d'EAE. La sobreexpressió d'IFN- $\gamma$  a nivell del SNC provoca una desmielinització progressiva en ratolins (Renno et al. 1998); i IL-1 $\beta$  és capaç de causar la mort d'oligodendròcits en cultiu (Takahashi et al. 2003) i sembla important en el dany neuronal i axonal al SNC de pacients amb EM (de Jong et al. 2002). Els resultats mostren una disminució en l'expressió de l'ARNm d'aquestes citocines en el grup d'animals PDE4A<sup>-/-</sup>. Això podria relacionar-se amb la tendència observada d'una menor severitat del model EAE en aquest grup d'animals.

Com ja s'ha comentat anteriorment, IL-6 i TGF- $\beta$  són citocines molt importants en el balanç entre les subpoblacions de cèl·lules T efectores Th17 i Tregs (Korn et al. 2007). La combinació de TGF- $\beta$  i IL-6 produeix la diferenciació a cèl·lules productores d'IL-17 (Th17) a partir de cèl·lules T naïf (Mangan et al. 2006); no obstant, TGF- $\beta$ , considerada una citocina amb capacitats immunosupressores, es capaç d'induir la generació de Tregs Foxp3<sup>+</sup> i inhibir la proliferació de les cèl·lules T naïf (Li et al. 2006). Els resultats van mostrar una tendència a l'augment de l'expressió de l'ARNm d'IL-6 en el grup d'animals

EAE PDE4B<sup>-/-</sup>, així com una disminució significativa de l'expressió de TGF-β respecte els ratolins EAE *wildtype*. Aquest canvi en el balanç entre aquestes dues citocines podria comportar una major diferenciació de cèl·lules Th17 a partir de les cèl·lules T naïf, que aportarien més patogenicitat al model i podrien ser la conseqüència d'un inici més avançat de l'aparició dels símptomes clínics en els ratolins PDE4B<sup>-/-</sup>. A més, sembla que els nivells d'expressió del factor de transcripció FoxP3, característic de les cèl·lules Tregs, es troben a uns nivells similars als dels animals control, fet que ens portaria a pensar que la disminució de TGF-β estaria impedit la diferenciació de les Tregs. Es coneix que la regulació dels nivells d'AMPc en cèl·lules dendrítiques té un paper clau en l'ambient de citocines alliberades (Fallarino et al. 2010) i l'eliminació de l'enzim PDE4B en aquestes cèl·lules podria estar modulant aquest procés (**Figura 1**).



**Figura 1. Possible paper de PDE4B en la regulació de la resposta immune en cèl·lules dendrítiques.**

En la hipòtesis que proposem, PDE4B actuaria disminuint els nivells d'AMPc intracel·lular en els animals EAE *wildtype*, fet que afavoriria la diferenciació de Tregs com a mecanisme neuroprotector. En els ratolins PDE4B<sup>-/-</sup>, la falta d'aquest enzim elevaria els nivells d'AMPc intracel·lular, afavorint la producció d'IL-6 i la diferenciació de Th17, fet que podria explicar una major patogenicitat i un inici temprà de l'EAE en aquests animals. Modificat de (Hansen and Caspi 2010).

Com ja s'ha mencionat, els experiments de colocalització han mostrar l'expressió de PDE4B en APCs com les cèl·lules dendrítiques. No obstant, no s'observa un augment en l'ARNm del factor de transcripció característic de les Th17, *Rorc*, en els animals PDE4B<sup>-/-</sup>, sinó que els seus nivells d'expressió són més baixos que els dels animals control. Més experiments per aïllar, caracteritzar i quantificar les diverses subpoblacions de cèl·lules efectores en els diferents grups de ratolins EAE serien necessaris per tal d'esbrinar quines podrien ser les conseqüències d'aquest possible canvi en el balanç de TGF- $\beta$  i IL-6.

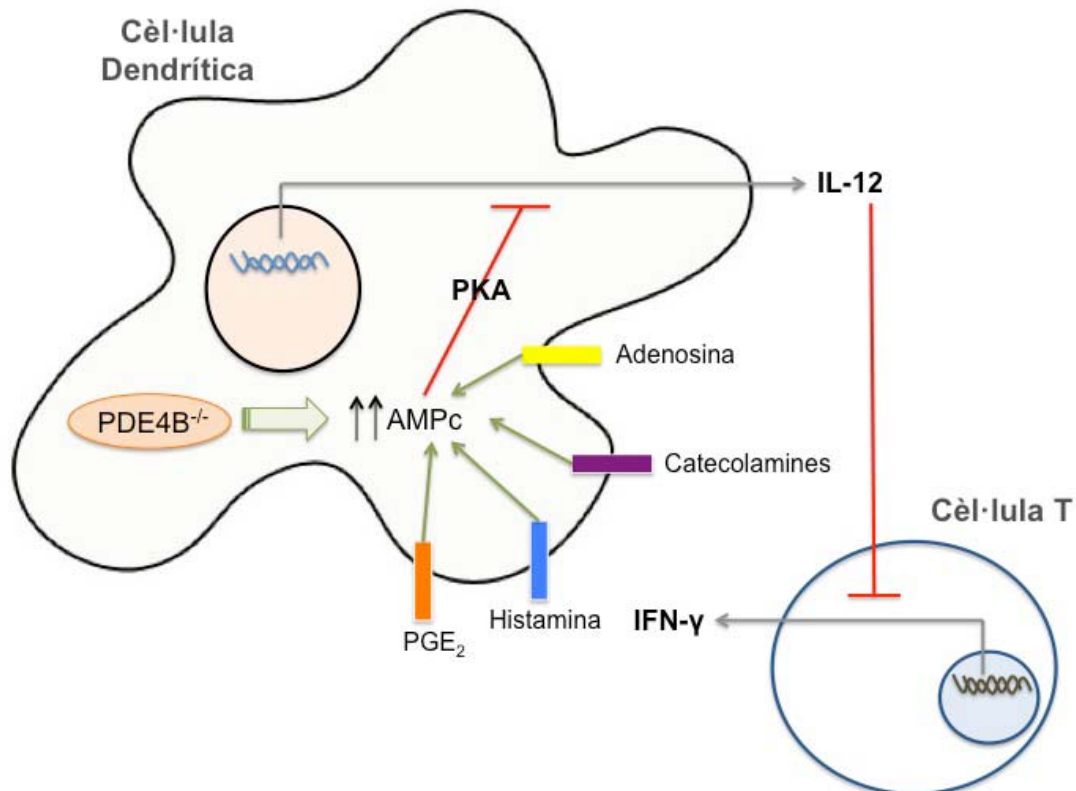
Una altra possible explicació seria que en el grup d'animals EAE PDE4B<sup>-/-</sup> es produís un canvi en el balanç Th1/Th2 i s'afavorís la resposta tipus Th2. El biaix cap a Th2 s'ha demostrat que empitjora els símptomes de l'EAE induïda per MOG (Lafaille et al. 1994). Però els nivells de producció d'IL-4, citocina característica d'aquesta subpoblació de cèl·lules efectores, post-estimulació antigènica en els leucòcits del grup PDE4B<sup>-/-</sup> no canvien respecte els animals *wildtype*. A més, els nivells del factor de transcripció *Gata3* es mantenen similars als tres grups experimentals amb EAE.

IFN- $\gamma$  és una citocina característica de la subpoblació de cèl·lules Th1, i a la vegada és capaç d'inhibir el factor de transcripció *Rorc* i així la diferenciació de les cèl·lules T naïf a Th17 (Axtell et al. 2010). Aquesta citocina és considerada proinflamatòria, però en el cas del model EAE produiria una disminució del nombre de cèl·lules Th17. Per aquest motiu vam determinar la producció d'IFN- $\gamma$  post-estimulació antigènica en els leucòcits aïllats dels ratolins *knockout* i *wildtype*. En els leucòcits d'animals PDE4A<sup>-/-</sup>, tot i observar una menor expressió de l'ARNm d'IFN- $\gamma$  en la seva medul·la espinal, semblava que aquestes cèl·lules eren capaces de produir IFN- $\gamma$  en resposta al seu antigen específic. Els resultats per PDE4B<sup>-/-</sup> foren diferents, amb una disminució de l'alliberació d'IFN- $\gamma$  per part d'aquestes cèl·lules post-estimulació antigènica. Aquestes observacions podrien indicar menys resposta Th1 en aquests animals transgènics i una tendència a afavorir la resposta Th17 degut a la falta d'inhibició del factor de transcripció *Rorc*.

IL-12, produïda per les APCs, és una citocina particularment efectiva en la inducció d'IFN- $\gamma$  (Watford et al. 2003). La transcripció d'aquesta citocina pot estar regulada a través de l'AMPc; de fet se sap que PGE<sub>2</sub>, que produeix un augment dels nivells d'AMPc, és capaç d'inhibir la producció d'IL-12 en monòcits humans (van der Pouw Kraan et al. 1995). Aquesta inhibició es produeix en les cèl·lules dendrítiques a través d'un mecanisme dependent de la via AMPc/PKA (Thierfelder et al. 1996). Per tant, la falta de PDE4B en les



cèl·lules dendrítiques d'aquests animals mantindria nivells elevats d'AMPc intracel·lular que podrien estar inhibint la producció d'IL-12 i d'aquesta forma l'alliberació d'IFN- $\gamma$  per part de les cèl·lules Th1 (**Figura 2**). Experiments per determinar els nivells d'IL-12 post-estimulació en aquestes cèl·lules i la implicació de PDE4B en aquest procés s'haurien de realitzar per tal de poder comprovar aquesta hipòtesis.



**Figura 2. Possible paper de PDE4B en la síntesis d'IFN- $\gamma$  induïda per IL-12.** L'elevació dels nivells intracel·lulars d'AMPc produïda per la senyalització a través de diversos receptors acoblats a proteïna G (PGE<sub>2</sub>, histamina, receptors  $\beta$ -adrenèrgics i d'adenosina) es mantindria en animals sense PDE4B en cèl·lules dendrítiques. L'AMPc, a través d'una via dependent de PKA, inhibiria la producció d'IL-12, que a la vegada bloquejaria l'alliberació d'IFN- $\gamma$  per part de les cèl·lules T. Basat en (Kang et al. 2005).

Tot i no observar canvis histopatològics clars entre els tres grups de ratolins EAE, un anàlisi preliminar del dany axonal mitjançant el marcatge de SMI32 semblava mostrar més presència d'aquest en el teixit cerebral dels ratolins PDE4B<sup>-/-</sup>, fet que podria correlacionar amb una aparició avançada dels símptomes d'EAE en aquests ratolins. En EAE i EM, els axons danyats esdevenen SMI32<sup>+</sup> (Wang et al. 2005; Petzold et al. 2008). Aquest dany axonal és dependent del temps en ratolins immunitzats amb MOG (Soulika et al. 2009), fet que ens portaria a pensar que si el grup d'animals PDE4B<sup>-/-</sup> han iniciat abans el desenvolupament de la malaltia puguin haver acumulat més dany axonal.

TNF- $\alpha$  també podria tenir un possible paper en aquest procés. Tot i les propietats proinflamatòries conegudes d'aquesta citocina, s'han descrit accions reparadores d'aquesta en oligodendròcits a través del receptor de TNF- $\alpha$  TNFR2 (Arnett et al. 2001). La falta de producció de TNF- $\alpha$  en els monòcits i macròfags d'aquests animals transgènics podria tenir efectes negatius en el desenvolupament de l'EAE. Cal destacar doncs les dues vessants de TNF- $\alpha$ : la possible acció remielinitzant a través de l'estimulació de la proliferació dels oligodendròcits via senyalització a través de TNFR2; o bé l'acció desmielinitzant i inflamatòria d'aquesta citocina mitjançant la unió a TNFR1 (Probert et al. 2000).

Cal tenir en compte que aquests resultats obtinguts amb animals transgènics són molt preliminars i que el nombre d'animals utilitzats és baix. Caldria repetir aquests experiments per tal de confirmar la seva validesa i realitzar-ne de nous per tal de comprovar algunes de les hipòtesis que es plantegen en aquesta discussió.



***Conclusions***

1. El model EAE es caracteritza per la presència d'infiltrats cel·lulars i zones de desmielinització al SNC, així com per degeneració axonal i neuronal, i per una resposta neuroimmune amb sobreexpressió de citocines proinflamatòries.
2. De les tres isoformes de PDE4 que es troben expressades en el SNC (PDE4A, PDE4B i PDE4D), només l'ARNm de la isoforma PDE4B es troba sobreexpressat en el SNC de ratolins amb EAE.
3. De les quatre variants d'*splicing* de PDE4B, tan sols l'ARNm de PDE4B2 es troba sobreexpressat en els SNC de ratolins amb EAE progressiva crònica i en aquells que presenten una simptomatologia més severa.
4. La sobreexpressió de l'ARNm de PDE4B2 comença a la medul·la espinal i es va expandint cap a àrees anteriors del SNC en els ratolins EAE, seguint un patró comparable al dels infiltrats cel·lulars presents en aquests animals, suggerint que aquesta sobreexpressió podria tenir lloc en aquestes cèl·lules.
5. La sobreexpressió de l'ARNm de PDE4B2 correlaciona amb l'expressió observada per FoxP3 (factor de transcripció característic de les cèl·lules Tregs) i TGF- $\beta$  (citocina antiinflamatòria capaç d'induir la generació de les cèl·lules Tregs), indicant un possible paper d'aquest enzim en la diferenciació d'aquest tipus de cèl·lules T.
6. La proteïna PDE4B es troba expressada en les cèl·lules presentadores d'antigen (cèl·lules dendrítiques, macròfags i micròglia) en el SNC de ratolins amb EAE, indicant que el control dels nivells d'AMPc en aquest tipus de cèl·lules per part de PDE4B2 podria tenir un paper important en la regulació d'alguna de les seves funcions.
7. Els ratolins PDE4B<sup>-/-</sup> amb EAE presenten un inici temprà de la malaltia en comparació amb el grup *wildtype*, a diferència de la protecció envers la inducció d'EAE que s'esperava per aquests animals transgènics degut a la millora observada en animals EAE tractats amb inhibidors selectius per a PDE4.
8. Els animals amb EAE PDE4B<sup>-/-</sup> presenten un augment de l'expressió de l'ARNm d'IL-6 i una disminució de TGF- $\beta$ , suggerint que el canvi en el balanç d'aquestes citocines podria comportar una major diferenciació de les cèl·lules Th17. No obstant, els nivells del factor de transcripció d'aquestes cèl·lules T (Rorc) són més baixos respecte els animals *wildtype*.

9. Els leucòcits aïllats dels ratolins amb EAE PDE4B<sup>-/-</sup> i estimulats amb l'antigen de mielina presenten una disminució en l'alliberació d'IFN- $\gamma$ , fet que podria indicar una baixa resposta Th1 i una tendència a afavorir la resposta Th17 degut a la falta d'inhibició del factor de transcripció Rorc, que es troba reduït en aquests animals.
10. L'eliminació de PDE4B en les cèl·lules presentadores d'antigen mantindria nivells elevats d'AMPc intracel·lular, que podrien estar inhibint la producció d'IL-12 i d'aquesta forma l'alliberació d'IFN- $\gamma$  per part de les cèl·lules Th1.
11. Els resultats mostren una disminució en l'expressió de l'ARNm de les citocines proinflamatòries IFN- $\gamma$  i IL-1 $\beta$  en animals PDE4A<sup>-/-</sup> amb EAE, fet que podria relacionar-se amb la tendència observada d'una menor severitat simptomatològica d'aquests animals respecte els ratolins *wildtype*.

## CONCLUSIÓ FINAL

L'alteració selectiva de la PDE4B2 en el model d'EAE en ratolí i la seva participació en el desenvolupament de la malaltia com s'ha observat en els animals PDE4B<sup>-/-</sup> presenta noves possibilitats sobre l'ús d'inhibidors selectius per les diverses isoformes (o variants d'*splicing*), tant per aplicacions terapèutiques com per investigar mecanismes inflamatoris en malalties neurodegeneratives.

## ***Bibliografia***

## Bibliografia

- Abbas, A. K., Murphy, K. M. and Sher, A. (1996). "Functional diversity of helper T lymphocytes." *Nature* **383**(6603): 787-793.
- Abrahamsen, H., Baillie, G., Ngai, J., Vang, T., Nika, K., Ruppelt, A., Mustelin, T., Zaccolo, M., Houslay, M. and Tasken, K. (2004). "TCR- and CD28-mediated recruitment of phosphodiesterase 4 to lipid rafts potentiates TCR signaling." *Journal of immunology* **173**(8): 4847-4858.
- Acosta-Rodriguez, E. V., Napolitani, G., Lanzavecchia, A. and Sallusto, F. (2007). "Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells." *Nat.Immunol.* **8**(9): 942-949.
- Acosta-Rodriguez, E. V., Rivino, L., Geginat, J., Jarrossay, D., Gattorno, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F. and Napolitani, G. (2007). "Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells." *Nat.Immunol.* **8**(6): 639-646.
- Acuto, O. and Michel, F. (2003). "CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling." *Nature reviews. Immunology* **3**(12): 939-951.
- Akira, S. and Hemmi, H. (2003). "Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family." *Immunol.Lett.* **85**(2): 85-95.
- Almolda, B., Gonzalez, B. and Castellano, B. (2010). "Activated microglial cells acquire an immature dendritic cell phenotype and may terminate the immune response in an acute model of EAE." *J.Neuroimmunol.* **223**(1-2): 39-54.
- Almolda, B., Gonzalez, B. and Castellano, B. (2011). "Antigen presentation in EAE: role of microglia, macrophages and dendritic cells." *Front Biosci.* **16**: 1157-1171.
- Aloisi, F. (2001). "Immune function of microglia." *Glia* **36**(2): 165-179.
- Aloisi, F., Ria, F. and Adorini, L. (2000). "Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes." *Immunol.Today* **21**(3): 141-147.
- Alon, R. and Feigelson, S. (2002). "From rolling to arrest on blood vessels: leukocyte tap dancing on endothelial integrin ligands and chemokines at sub-second contacts." *Seminars in immunology* **14**(2): 93-104.
- Ambrosini, E., Remoli, M. E., Giacomini, E., Rosicarelli, B., Serafini, B., Lande, R., Aloisi, F. and Coccia, E. M. (2005). "Astrocytes produce dendritic cell-attracting chemokines in vitro and in multiple sclerosis lesions." *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* **64**(8): 706-715.
- Andersson, A., Covacu, R., Sunnemark, D., Danilov, A. I., Dal Bianco, A., Khademi, M., Wallstrom, E., Lobell, A., Brundin, L., Lassmann, H. and Harris, R. A. (2008). "Pivotal advance: HMGB1 expression in active lesions of human and experimental multiple sclerosis." *J.Leukoc.Biol.* **84**(5): 1248-1255.
- Araki, M., Kondo, T., Gumperz, J. E., Brenner, M. B., Miyake, S. and Yamamura, T. (2003). "Th2 bias of CD4+ NKT cells derived from multiple sclerosis in remission." *International immunology* **15**(2): 279-288.
- Ariga, M., Neitzert, B., Nakae, S., Mottin, G., Bertrand, C., Pruniaux, M. P., Jin, S. L. and Conti, M. (2004). "Nonredundant function of phosphodiesterases 4D and 4B in neutrophil recruitment to the site of inflammation." *Journal of immunology* **173**(12): 7531-7538.

- Arnett, H. A., Mason, J., Marino, M., Suzuki, K., Matsushima, G. K. and Ting, J. P. (2001). "TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination." Nat.Neurosci. **4**(11): 1116-1122.
- Aronoff, D. M., Carstens, J. K., Chen, G. H., Toews, G. B. and Peters-Golden, M. (2006). "Short communication: differences between macrophages and dendritic cells in the cyclic AMP-dependent regulation of lipopolysaccharide-induced cytokine and chemokine synthesis." Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research **26**(11): 827-833.
- Arp, J., Kirchhof, M. G., Baroja, M. L., Nazarian, S. H., Chau, T. A., Strathdee, C. A., Ball, E. H. and Madrenas, J. (2003). "Regulation of T-cell activation by phosphodiesterase 4B2 requires its dynamic redistribution during immunological synapse formation." Mol.Cell Biol. **23**(22): 8042-8057.
- Au, B. T., Teixeira, M. M., Collins, P. D. and Williams, T. J. (1998). "Effect of PDE4 inhibitors on zymosan-induced IL-8 release from human neutrophils: synergism with prostanoids and salbutamol." British Journal of Pharmacology **123**(6): 1260-1266.
- Axtell, R. C., de Jong, B. A., Boniface, K., van der Voort, L. F., Bhat, R., De Sarno, P., Naves, R., Han, M., Zhong, F., Castellanos, J. G., Mair, R., Christakos, A., Kolkowitz, I., Katz, L., Killestein, J., Polman, C. H., de Waal Malefyt, R., Steinman, L. and Raman, C. (2010). "T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon-beta in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis." Nat Med **16**(4): 406-412.
- Bai, L., Lennon, D. P., Eaton, V., Maier, K., Caplan, A. I., Miller, S. D. and Miller, R. H. (2009). "Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis." Glia **57**(11): 1192-1203.
- Bailey, S. L., Schreiner, B., McMahon, E. J. and Miller, S. D. (2007). "CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides 'preferentially' polarize CD4+ T(H)-17 cells in relapsing EAE." Nat.Immunol. **8**(2): 172-180.
- Baillie, G. S. and Houslay, M. D. (2005). "Arrestin times for compartmentalised cAMP signalling and phosphodiesterase-4 enzymes." Curr.Opin.Cell Biol. **17**(2): 129-134.
- Baillie, G. S., MacKenzie, S. J., McPhee, I. and Houslay, M. D. (2000). "Sub-family selective actions in the ability of Erk2 MAP kinase to phosphorylate and regulate the activity of PDE4 cyclic AMP-specific phosphodiesterases." British Journal of Pharmacology **131**(4): 811-819.
- Banner, K. H. and Trevethick, M. A. (2004). "PDE4 inhibition: a novel approach for the treatment of inflammatory bowel disease." Trends Pharmacol Sci. **25**(8): 430-436.
- Baroja, M. L., Cieslinski, L. B., Torphy, T. J., Wange, R. L. and Madrenas, J. (1999). "Specific CD3 epsilon association of a phosphodiesterase 4B isoform determines its selective tyrosine phosphorylation after CD3 ligation." Journal of immunology **162**(4): 2016-2023.
- Barry, M. and Bleackley, R. C. (2002). "Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death." Nature reviews. Immunology **2**(6): 401-409.
- Beard, M. B., Olsen, A. E., Jones, R. E., Erdogan, S., Houslay, M. D. and Bolger, G. B. (2000). "UCR1 and UCR2 domains unique to the cAMP-specific phosphodiesterase family form a discrete module via electrostatic interactions." The Journal of biological chemistry **275**(14): 10349-10358.

## Bibliografia

- Beavo, J. A., Conti, M. and Heaslip, R. J. (1994). "Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterases." Mol.Pharmacol. **46**(3): 399-405.
- Beavo, J. A., Hansen, R. S., Harrison, S. A., Hurwitz, R. L., Martins, T. J. and Mumby, M. C. (1982). "Identification and properties of cyclic nucleotide phosphodiesterases." Mol.Cell Endocrinol. **28**(3): 387-410.
- Bender, A. T. and Beavo, J. A. (2006). "Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use." Pharmacol Rev. **58**(3): 488-520.
- Bender, A. T., Ostenson, C. L., Giordano, D. and Beavo, J. A. (2004). "Differentiation of human monocytes in vitro with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and macrophage colony-stimulating factor produces distinct changes in cGMP phosphodiesterase expression." Cell Signal. **16**(3): 365-374.
- Bender, A. T., Ostenson, C. L., Wang, E. H. and Beavo, J. A. (2005). "Selective up-regulation of PDE1B2 upon monocyte-to-macrophage differentiation." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(2): 497-502.
- Berthet, J., Makman, M. H. and Sutherland, E. W. (1956). "Observations on the action of certain sulfonylurea derivatives." Metabolism: clinical and experimental **5**(6 Part 2): 768-773.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Weiner, H. L. and Kuchroo, V. K. (2006). "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells." Nature **441**(7090): 235-238.
- Blander, J. M. and Medzhitov, R. (2006). "Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells." Nature **440**(7085): 808-812.
- Bloom, T. J. and Beavo, J. A. (1996). "Identification and tissue-specific expression of PDE7 phosphodiesterase splice variants." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(24): 14188-14192.
- Boess, F. G., Hendrix, M., van der Staay, F. J., Erb, C., Schreiber, R., van Staveren, W., de Vente, J., Prickaerts, J., Blokland, A. and Koenig, G. (2004). "Inhibition of phosphodiesterase 2 increases neuronal cGMP, synaptic plasticity and memory performance." Neuropharmacology **47**(7): 1081-1092.
- Bolger, G., Michaeli, T., Martins, T., St John, T., Steiner, B., Rodgers, L., Riggs, M., Wigler, M. and Ferguson, K. (1993). "A family of human phosphodiesterases homologous to the dunce learning and memory gene product of *Drosophila melanogaster* are potential targets for antidepressant drugs." Molecular and cellular biology **13**(10): 6558-6571.
- Borrelli, E., Montmayeur, J. P., Foulkes, N. S. and Sassone-Corsi, P. (1992). "Signal transduction and gene control: the cAMP pathway." Critical reviews in oncogenesis **3**(4): 321-338.
- Bos, J. L. (2003). "Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research." Nature reviews. Molecular cell biology **4**(9): 733-738.
- Bradshaw, N. J. and Porteous, D. J. (2010). "DISC1-binding proteins in neural development, signalling and schizophrenia." Neuropharmacology.
- Brandon, E. P., Idzerda, R. L. and McKnight, G. S. (1997). "PKA isoforms, neural pathways, and behaviour: making the connection." Current opinion in neurobiology **7**(3): 397-403.



- Bromley, S. K., Burack, W. R., Johnson, K. G., Somersalo, K., Sims, T. N., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M. and Dustin, M. L. (2001). "The immunological synapse." Annual review of immunology **19**: 375-396.
- Brown, D. A. and Sawchenko, P. E. (2007). "Time course and distribution of inflammatory and neurodegenerative events suggest structural bases for the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis." J.Comp Neurol. **502**(2): 236-260.
- Bsibsi, M., Ravid, R., Gveric, D. and van Noort, J. M. (2002). "Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system." J.Neuropathol.Exp.Neurol. **61**(11): 1013-1021.
- Butcher, R. W. and Sutherland, E. W. (1962). "Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine." The Journal of biological chemistry **237**: 1244-1250.
- Cali, J. J., Zwaagstra, J. C., Mons, N., Cooper, D. M. and Krupinski, J. (1994). "Type VIII adenylyl cyclase. A Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-stimulated enzyme expressed in discrete regions of rat brain." J.Biol.Chem. **269**(16): 12190-12195.
- Card, G. L., England, B. P., Suzuki, Y., Fong, D., Powell, B., Lee, B., Luu, C., Tabrizizad, M., Gillette, S., Ibrahim, P. N., Artis, D. R., Bollag, G., Milburn, M. V., Kim, S. H., Schlessinger, J. and Zhang, K. Y. (2004). "Structural basis for the activity of drugs that inhibit phosphodiesterases." Structure. **12**(12): 2233-2247.
- Carnegie, G. K., Means, C. K. and Scott, J. D. (2009). "A-kinase anchoring proteins: from protein complexes to physiology and disease." IUBMB life **61**(4): 394-406.
- Carpentier, P. A., Begolka, W. S., Olson, J. K., Elhofy, A., Karpus, W. J. and Miller, S. D. (2005). "Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli." Glia **49**(3): 360-374.
- Carpentier, P. A., Duncan, D. S. and Miller, S. D. (2008). "Glial toll-like receptor signaling in central nervous system infection and autoimmunity." Brain Behav.Immun. **22**(2): 140-147.
- Carrera, A., Moos, J., Ning, X. P., Gerton, G. L., Tesarik, J., Kopf, G. S. and Moss, S. B. (1996). "Regulation of protein tyrosine phosphorylation in human sperm by a calcium/calmodulin-dependent mechanism: identification of A kinase anchor proteins as major substrates for tyrosine phosphorylation." Developmental biology **180**(1): 284-296.
- Caux, C., Ait-Yahia, S., Chemin, K., de Bouteiller, O., Dieu-Nosjean, M. C., Homey, B., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Zlotnik, A. and Vicari, A. (2000). "Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines." Springer seminars in immunopathology **22**(4): 345-369.
- Chang, Y. C., Li, P. C., Chen, B. C., Chang, M. S., Wang, J. L., Chiu, W. T. and Lin, C. H. (2006). "Lipoteichoic acid-induced nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages is mediated by cyclooxygenase-2, prostaglandin E2, protein kinase A, p38 MAPK, and nuclear factor-kappaB pathways." Cellular signalling **18**(8): 1235-1243.
- Chen, J. and Iyengar, R. (1994). "Suppression of Ras-induced transformation of NIH 3T3 cells by activated G alpha s." Science **263**(5151): 1278-1281.
- Chen-Goodspeed, M., Lukan, A. N. and Dessauer, C. W. (2005). "Modeling of Galpha(s) and Galpha(i) regulation of human type V and VI adenylyl cyclase." The Journal of biological chemistry **280**(3): 1808-1816.

## Bibliografia

- Cheung, W. Y. (1970). "Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase. Demonstration of an activator." Biochem.Biophys.Res.Commun. **38**(3): 533-538.
- Chio, C. C., Chang, Y. H., Hsu, Y. W., Chi, K. H. and Lin, W. W. (2004). "PKA-dependent activation of PKC, p38 MAPK and IKK in macrophage: implication in the induction of inducible nitric oxide synthase and interleukin-6 by dibutyryl cAMP." Cellular signalling **16**(5): 565-575.
- Choi, E. J., Xia, Z. and Storm, D. R. (1992). "Stimulation of the type III olfactory adenylyl cyclase by calcium and calmodulin." Biochemistry **31**(28): 6492-6498.
- Colonna, M., Trinchieri, G. and Liu, Y. J. (2004). "Plasmacytoid dendritic cells in immunity." Nature immunology **5**(12): 1219-1226.
- Constantinescu, C. S., Tani, M., Ransohoff, R. M., Wysocka, M., Hilliard, B., Fujioka, T., Murphy, S., Tighe, P. J., Das, S. J., Trinchieri, G. and Rostami, A. (2005). "Astrocytes as antigen-presenting cells: expression of IL-12/IL-23." J.Neurochem. **95**(2): 331-340.
- Conti, M., Nemoz, G., Sette, C. and Vicini, E. (1995). "Recent progress in understanding the hormonal regulation of phosphodiesterases." Endocr.Rev. **16**(3): 370-389.
- Cooper, D. M. (2003). "Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP." The Biochemical journal **375**(Pt 3): 517-529.
- Cooper, D. M. and Brooker, G. (1993). "Ca(2+)-inhibited adenylyl cyclase in cardiac tissue." Trends in pharmacological sciences **14**(2): 34-36.
- Coquil, J. F., Franks, D. J., Wells, J. N., Dupuis, M. and Hamet, P. (1980). "Characteristics of a new binding protein distinct from the kinase for guanosine 3':5'-monophosphate in rat platelets." Biochim.Biophys.Acta **631**(1): 148-165.
- Cortes, R., Mengod, G., Celada, P. and Artigas, F. (1993). "p-chlorophenylalanine increases tryptophan-5-hydroxylase mRNA levels in the rat dorsal raphe: a time course study using in situ hybridization." J.Neurochem. **60**(2): 761-764.
- Cote, M., Payet, M. D., Rousseau, E., Guillon, G. and Gallo-Payet, N. (1999). "Comparative involvement of cyclic nucleotide phosphodiesterases and adenylyl cyclase on adrenocorticotropin-induced increase of cyclic adenosine monophosphate in rat and human glomerulosa cells." Endocrinology **140**(8): 3594-3601.
- Cote, R. H. (2004). "Characteristics of photoreceptor PDE (PDE6): similarities and differences to PDE5." Int.J.Impot.Res. **16 Suppl 1**: S28-S33.
- Dalpke, A. and Heeg, K. (2002). "Signal integration following Toll-like receptor triggering." Critical reviews in immunology **22**(3): 217-250.
- de Jong, B. A., Huizinga, T. W., Bollen, E. L., Uitdehaag, B. M., Bosma, G. P., van Buchem, M. A., Remarque, E. J., Burgmans, A. C., Kalkers, N. F., Polman, C. H. and Westendorp, R. G. (2002). "Production of IL-1beta and IL-1Ra as risk factors for susceptibility and progression of relapse-onset multiple sclerosis." Journal of Neuroimmunology **126**(1-2): 172-179.
- Degerman, E., Landstrom, T. R., Wijkander, J., Holst, L. S., Ahmad, F., Belfrage, P. and Manganiello, V. (1998). "Phosphorylation and activation of hormone-sensitive adipocyte phosphodiesterase type 3B." Methods **14**(1): 43-53.

- DeLuca, G. C., Williams, K., Evangelou, N., Ebers, G. C. and Esiri, M. M. (2006). "The contribution of demyelination to axonal loss in multiple sclerosis." Brain : a journal of neurology **129**(Pt 6): 1507-1516.
- Demarco, I. A., Espinosa, F., Edwards, J., Sosnik, J., De La Vega-Beltran, J. L., Hockensmith, J. W., Kopf, G. S., Darszon, A. and Visconti, P. E. (2003). "Involvement of a Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter in mouse sperm capacitation." The Journal of biological chemistry **278**(9): 7001-7009.
- Deshpande, P., King, I. L. and Segal, B. M. (2007). "Cutting edge: CNS CD11c<sup>+</sup> cells from mice with encephalomyelitis polarize Th17 cells and support CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cell-mediated immunosuppression, suggesting dual roles in the disease process." J.Immunol. **178**(11): 6695-6699.
- Dessauer, C. W. and Nguyen, B. T. (2005). "Relaxin stimulates multiple signaling pathways: activation of cAMP, PI3K, and PKCzeta in THP-1 cells." Annals of the New York Academy of Sciences **1041**: 272-279.
- Dessauer, C. W., Scully, T. T. and Gilman, A. G. (1997). "Interactions of forskolin and ATP with the cytosolic domains of mammalian adenylyl cyclase." The Journal of biological chemistry **272**(35): 22272-22277.
- Di, A., Brown, M. E., Deriy, L. V., Li, C., Szeto, F. L., Chen, Y., Huang, P., Tong, J., Naren, A. P., Bindokas, V., Palfrey, H. C. and Nelson, D. J. (2006). "CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity." Nature cell biology **8**(9): 933-944.
- Dodge, K. L., Khouangsathiene, S., Kapiloff, M. S., Mouton, R., Hill, E. V., Houslay, M. D., Langeberg, L. K. and Scott, J. D. (2001). "mAKAP assembles a protein kinase A/PDE4 phosphodiesterase cAMP signaling module." The EMBO journal **20**(8): 1921-1930.
- Dogan, R. N., Elhofy, A. and Karpus, W. J. (2008). "Production of CCL2 by central nervous system cells regulates development of murine experimental autoimmune encephalomyelitis through the recruitment of TNF- and iNOS-expressing macrophages and myeloid dendritic cells." J.Immunol. **180**(11): 7376-7384.
- Donohue, T., Hoffman, P. L. and Tabakoff, B. (2005). "Effect of ethanol on DARPP-32 phosphorylation in transgenic mice that express human type VII adenylyl cyclase in brain." Alcoholism, clinical and experimental research **29**(3): 310-316.
- Duda, P. W., Schmied, M. C., Cook, S. L., Krieger, J. I. and Hafler, D. A. (2000). "Glatiramer acetate (Copaxone) induces degenerate, Th2-polarized immune responses in patients with multiple sclerosis." The Journal of clinical investigation **105**(7): 967-976.
- Duhant, X., Schandene, L., Bruyns, C., Gonzalez, N. S., Goldman, M., Boeynaems, J. M. and Communi, D. (2002). "Extracellular adenine nucleotides inhibit the activation of human CD4<sup>+</sup> T lymphocytes." Journal of immunology **169**(1): 15-21.
- Dustin, M. L. (2001). "Role of adhesion molecules in activation signaling in T lymphocytes." Journal of clinical immunology **21**(4): 258-263.
- Ehnert, C., Tegeder, I., Pierre, S., Birod, K., Nguyen, H. V., Schmidtko, A., Geisslinger, G. and Scholich, K. (2004). "Protein associated with Myc (PAM) is involved in spinal nociceptive processing." Journal of Neurochemistry **88**(4): 948-957.

## Bibliografia

- Eigler, A., Siegmund, B., Emmerich, U., Baumann, K. H., Hartmann, G. and Endres, S. (1998). "Anti-inflammatory activities of cAMP-elevating agents: enhancement of IL-10 synthesis and concurrent suppression of TNF production." Journal of leukocyte biology **63**(1): 101-107.
- Engels, P., Sullivan, M., Muller, T. and Lubbert, H. (1995). "Molecular cloning and functional expression in yeast of a human cAMP-specific phosphodiesterase subtype (PDE IV-C)." FEBS letters **358**(3): 305-310.
- Esposito, G., Jaiswal, B. S., Xie, F., Krajnc-Franken, M. A., Robben, T. J., Strik, A. M., Kuil, C., Philipson, R. L., van Duin, M., Conti, M. and Gossen, J. A. (2004). "Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(9): 2993-2998.
- Essayan, D. M. (2001). "Cyclic nucleotide phosphodiesterases." J.Allergy Clin.Immunol. **108**(5): 671-680.
- Ezeamuzie, C. I. and Taslim, N. (2008). "Protein kinase C- and reactive oxygen species-dependent stimulation of intracellular cAMP in human eosinophils. The role of extracellular signal-regulated protein kinases." Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre **17**(6): 468-474.
- Fabriek, B. O., Van Haastert, E. S., Galea, I., Polfliet, M. M., Dopp, E. D., Van Den Heuvel, M. M., van den Berg, T. K., De Groot, C. J., Van, D. V. and Dijkstra, C. D. (2005). "CD163-positive perivascular macrophages in the human CNS express molecules for antigen recognition and presentation." Glia **51**(4): 297-305.
- Fagan, K. A., Mons, N. and Cooper, D. M. (1998). "Dependence of the Ca<sup>2+</sup>-inhibitable adenylyl cyclase of C6-2B glioma cells on capacitative Ca<sup>2+</sup> entry." The Journal of biological chemistry **273**(15): 9297-9305.
- Fallarino, F., Volpi, C., Fazio, F., Notartomaso, S., Vacca, C., Busceti, C., Bicciato, S., Battaglia, G., Bruno, V., Puccetti, P., Fioretti, M. C., Nicoletti, F., Grohmann, U. and Di Marco, R. (2010). "Metabotropic glutamate receptor-4 modulates adaptive immunity and restrains neuroinflammation." Nat.Med. **16**(8): 897-902.
- Farber, D. B. and Tsang, S. H. (2003). "Stationary night blindness or progressive retinal degeneration in mice carrying different alleles of PDE gamma." Front Biosci. **8**: s666-s675.
- Fassbender, M., Gerlitzki, B., Ullrich, N., Lupp, C., Klein, M., Radsak, M. P., Schmitt, E., Bopp, T. and Schild, H. (2010). "Cyclic adenosine monophosphate and IL-10 coordinately contribute to nTreg cell-mediated suppression of dendritic cell activation." Cellular immunology **265**(2): 91-96.
- Fawcett, L., Baxendale, R., Stacey, P., McGrouther, C., Harrow, I., Soderling, S., Hetman, J., Beavo, J. A. and Phillips, S. C. (2000). "Molecular cloning and characterization of a distinct human phosphodiesterase gene family: PDE11A." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **97**(7): 3702-3707.
- Ferguson, B., Matyszak, M. K., Esiri, M. M. and Perry, V. H. (1997). "Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions." Brain : a journal of neurology **120 ( Pt 3)**: 393-399.
- Fischer, H. G. and Reichmann, G. (2001). "Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation." J.Immunol. **166**(4): 2717-2726.

Fisher, D. A., Smith, J. F., Pillar, J. S., St Denis, S. H. and Cheng, J. B. (1998). "Isolation and characterization of PDE8A, a novel human cAMP-specific phosphodiesterase." Biochem.Biophys.Res.Commun. **246**(3): 570-577.

Fisher, D. A., Smith, J. F., Pillar, J. S., St Denis, S. H. and Cheng, J. B. (1998). "Isolation and characterization of PDE9A, a novel human cGMP-specific phosphodiesterase." J.Biol.Chem. **273**(25): 15559-15564.

Flugel, A., Berkowicz, T., Ritter, T., Labeur, M., Jenne, D. E., Li, Z., Ellwart, J. W., Willem, M., Lassmann, H. and Wekerle, H. (2001). "Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis." Immunity **14**(5): 547-560.

Folcik, V. A., Smith, T., O'Bryant, S., Kawczak, J. A., Zhu, B., Sakurai, H., Kajiwara, A., Staddon, J. M., Glabinski, A., Chernosky, A. L., Tani, M., Johnson, J. M., Tuohy, V. K., Rubin, L. L. and Ransohoff, R. M. (1999). "Treatment with BBB022A or rolipram stabilizes the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis: an additional mechanism for the therapeutic effect of type IV phosphodiesterase inhibitors." J.Neuroimmunol. **97**(1-2): 119-128.

Fooksman, D. R., Vardhana, S., Vasiliver-Shamis, G., Liese, J., Blair, D. A., Waite, J., Sacristan, C., Victora, G. D., Zanin-Zhorov, A. and Dustin, M. L. (2010). "Functional anatomy of T cell activation and synapse formation." Annual review of immunology **28**: 79-105.

Francis, S. H., Lincoln, T. M. and Corbin, J. D. (1980). "Characterization of a novel cGMP binding protein from rat lung." J.Biol.Chem. **255**(2): 620-626.

Friis, U. G., Jensen, B. L., Sethi, S., Andreasen, D., Hansen, P. B. and Skott, O. (2002). "Control of renin secretion from rat juxtaglomerular cells by cAMP-specific phosphodiesterases." Circulation research **90**(9): 996-1003.

Fujishige, K., Kotera, J. and Omori, K. (1999). "Striatum- and testis-specific phosphodiesterase PDE10A isolation and characterization of a rat PDE10A." Eur.J.Biochem. **266**(3): 1118-1127.

Fukuhara, S., Sakurai, A., Sano, H., Yamagishi, A., Somekawa, S., Takakura, N., Saito, Y., Kangawa, K. and Mochizuki, N. (2005). "Cyclic AMP potentiates vascular endothelial cadherin-mediated cell-cell contact to enhance endothelial barrier function through an Epac-Rap1 signaling pathway." Molecular and cellular biology **25**(1): 136-146.

Furlan, R., Bergami, A., Brambilla, E., Butti, E., De Simoni, M. G., Campagnoli, M., Marconi, P., Comi, G. and Martino, G. (2007). "HSV-1-mediated IL-1 receptor antagonist gene therapy ameliorates MOG(35-55)-induced experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice." Gene therapy **14**(1): 93-98.

Gal, A., Orth, U., Baehr, W., Schwinger, E. and Rosenberg, T. (1994). "Heterozygous missense mutation in the rod cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene in autosomal dominant stationary night blindness." Nat.Genet. **7**(4): 551.

Garay, J., D'Angelo, J. A., Park, Y., Summa, C. M., Aiken, M. L., Morales, E., Badizadegan, K., Fiebiger, E. and Dickinson, B. L. (2010). "Crosstalk between PKA and Epac regulates the phenotypic maturation and function of human dendritic cells." Journal of immunology **185**(6): 3227-3238.



## **Bibliografia**

Gardner, C., Robas, N., Cawkill, D. and Fidock, M. (2000). "Cloning and characterization of the human and mouse PDE7B, a novel cAMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase." Biochem.Biophys.Res.Commun. **272**(1): 186-192.

Gasperini, S., Crepaldi, L., Calzetti, F., Gatto, L., Berlato, C., Bazzoni, F., Yoshimura, A. and Cassatella, M. A. (2002). "Interleukin-10 and cAMP-elevating agents cooperate to induce suppressor of cytokine signaling-3 via a protein kinase A-independent signal." European cytokine network **13**(1): 47-53.

Gavin, M. A., Rasmussen, J. P., Fontenot, J. D., Vasta, V., Manganiello, V. C., Beavo, J. A. and Rudensky, A. Y. (2007). "Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation." Nature **445**(7129): 771-775.

Gerlo, S., Verdood, P., Hooghe-Peters, E. L. and Kooijman, R. (2006). "Multiple cAMP-induced signaling cascades regulate prolactin expression in T cells." Cellular and molecular life sciences : CMLS **63**(1): 92-99.

Gilman, A. G. (1987). "G proteins: transducers of receptor-generated signals." Annual review of biochemistry **56**: 615-649.

Giordano, D., De Stefano, M. E., Citro, G., Modica, A. and Giorgi, M. (2001). "Expression of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in mouse tissues and cell lines using an antibody against the enzyme amino-terminal domain." Biochim.Biophys.Acta **1539**(1-2): 16-27.

Giovannoni, G. and Ebers, G. (2007). "Multiple sclerosis: the environment and causation." Current opinion in neurology **20**(3): 261-268.

Glavas, N. A., Ostenson, C., Schaefer, J. B., Vasta, V. and Beavo, J. A. (2001). "T cell activation up-regulates cyclic nucleotide phosphodiesterases 8A1 and 7A3." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **98**(11): 6319-6324.

Glimcher, L. H. (2001). "Lineage commitment in lymphocytes: controlling the immune response." J.Clin.Invest **108**(7): s25-s30.

Gold, R., Hartung, H. P. and Toyka, K. V. (2000). "Animal models for autoimmune demyelinating disorders of the nervous system." Mol.Med.Today **6**(2): 88-91.

Gold, R., Linington, C. and Lassmann, H. (2006). "Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research." Brain **129**(Pt 8): 1953-1971.

Goldberg, N. D., Ames, A. A., III, Gander, J. E. and Walseth, T. F. (1983). "Magnitude of increase in retinal cGMP metabolic flux determined by <sup>18</sup>O incorporation into nucleotide alpha-phosphoryls corresponds with intensity of photic stimulation." J.Biol.Chem. **258**(15): 9213-9219.

Gong, B., Wang, H., Gu, S., Heximer, S. P. and Zhuo, M. (2007). "Genetic evidence for the requirement of adenylyl cyclase 1 in synaptic scaling of forebrain cortical neurons." The European journal of neuroscience **26**(2): 275-288.

Gonzalo, J. A., Delaney, T., Corcoran, J., Goodearl, A., Gutierrez-Ramos, J. C. and Coyle, A. J. (2001). "Cutting edge: the related molecules CD28 and inducible costimulator deliver both unique and complementary signals required for optimal T cell activation." Journal of immunology **166**(1): 1-5.

- Goraya, T. A. and Cooper, D. M. (2005). "Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent phosphodiesterase (PDE1): current perspectives." Cell Signal. **17**(7): 789-797.
- Greter, M., Heppner, F. L., Lemos, M. P., Odermatt, B. M., Goebels, N., Laufer, T., Noelle, R. J. and Becher, B. (2005). "Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis." Nat.Med. **11**(3): 328-334.
- Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C. and Amigorena, S. (2002). "Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells." Annual review of immunology **20**: 621-667.
- Guillou, J. L., Nakata, H. and Cooper, D. M. (1999). "Inhibition by calcium of mammalian adenylyl cyclases." J.Biol.Chem. **274**(50): 35539-35545.
- Guipponi, M., Scott, H. S., Kudoh, J., Kawasaki, K., Shibuya, K., Shintani, A., Asakawa, S., Chen, H., Lalioti, M. D., Rossier, C., Minoshima, S., Shimizu, N. and Antonarakis, S. E. (1998). "Identification and characterization of a novel cyclic nucleotide phosphodiesterase gene (PDE9A) that maps to 21q22.3: alternative splicing of mRNA transcripts, genomic structure and sequence." Hum.Genet. **103**(4): 386-392.
- Hacker, B. M., Tomlinson, J. E., Wayman, G. A., Sultana, R., Chan, G., Villacres, E., Disteche, C. and Storm, D. R. (1998). "Cloning, chromosomal mapping, and regulatory properties of the human type 9 adenylyl cyclase (ADCY9)." Genomics **50**(1): 97-104.
- Hambleton, R., Krall, J., Tikishvili, E., Honeggar, M., Ahmad, F., Manganiello, V. C. and Movsesian, M. A. (2005). "Isoforms of cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE3 and their contribution to cAMP hydrolytic activity in subcellular fractions of human myocardium." The Journal of biological chemistry **280**(47): 39168-39174.
- Han, P., Zhu, X. and Michaeli, T. (1997). "Alternative splicing of the high affinity cAMP-specific phosphodiesterase (PDE7A) mRNA in human skeletal muscle and heart." J.Biol.Chem. **272**(26): 16152-16157.
- Hanisch, U. K. (2002). "Microglia as a source and target of cytokines." Glia **40**(2): 140-155.
- Hansen, A. M. and Caspi, R. R. (2010). "Glutamate joins the ranks of immunomodulators." Nature medicine **16**(8): 856-858.
- Hatzelmann, A., Morcillo, E. J., Lungarella, G., Adnot, S., Sanjar, S., Beume, R., Schudt, C. and Tenor, H. (2010). "The preclinical pharmacology of roflumilast - A selective, oral phosphodiesterase 4 inhibitor in development for chronic obstructive pulmonary disease." Pulm.Pharmacol Ther.
- Hauser, S. L. and Oksenberg, J. R. (2006). "The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration." Neuron **52**(1): 61-76.
- Hayes, J. S., Brunton, L. L. and Mayer, S. E. (1980). "Selective activation of particulate cAMP-dependent protein kinase by isoproterenol and prostaglandin E1." The Journal of biological chemistry **255**(11): 5113-5119.
- Heppner, F. L., Greter, M., Marino, D., Falsig, J., Raivich, G., Hovelmeyer, N., Waisman, A., Rulicke, T., Prinz, M., Priller, J., Becher, B. and Aguzzi, A. (2005). "Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis." Nat.Med. **11**(2): 146-152.

## Bibliografia

- Herve, D., Levi-Strauss, M., Marey-Semper, I., Verney, C., Tassin, J. P., Glowinski, J. and Girault, J. A. (1993). "G(olf) and Gs in rat basal ganglia: possible involvement of G(olf) in the coupling of dopamine D1 receptor with adenylyl cyclase." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **13**(5): 2237-2248.
- Hetman, J. M., Robas, N., Baxendale, R., Fidock, M., Phillips, S. C., Soderling, S. H. and Beavo, J. A. (2000). "Cloning and characterization of two splice variants of human phosphodiesterase 11A." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **97**(23): 12891-12895.
- Hickey, W. F. and Kimura, H. (1988). "Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo." Science **239**(4837): 290-292.
- Hoffmann, R., Baillie, G. S., MacKenzie, S. J., Yarwood, S. J. and Houslay, M. D. (1999). "The MAP kinase ERK2 inhibits the cyclic AMP-specific phosphodiesterase HSPDE4D3 by phosphorylating it at Ser579." The EMBO journal **18**(4): 893-903.
- Hori, S., Haury, M., Coutinho, A. and Demengeot, J. (2002). "Specificity requirements for selection and effector functions of CD25+4+ regulatory T cells in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **99**(12): 8213-8218.
- Houslay, M. D. (1995). "Compartmentalization of cyclic AMP phosphodiesterases, signalling 'crosstalk', desensitization and the phosphorylation of Gi-2 add cell specific personalization to the control of the levels of the second messenger cyclic AMP." Adv.Enzyme Regul. **35**: 303-338.
- Houslay, M. D. (1998). "Adaptation in cyclic AMP signalling processes: a central role for cyclic AMP phosphodiesterases." Seminars in cell & developmental biology **9**(2): 161-167.
- Houslay, M. D. (2001). "PDE4 cAMP-specific phosphodiesterases." Progress in nucleic acid research and molecular biology **69**: 249-315.
- Houslay, M. D., Baillie, G. S. and Maurice, D. H. (2007). "cAMP-Specific phosphodiesterase-4 enzymes in the cardiovascular system: a molecular toolbox for generating compartmentalized cAMP signaling." Circulation research **100**(7): 950-966.
- Hucho, T. and Levine, J. D. (2007). "Signaling pathways in sensitization: toward a nociceptor cell biology." Neuron **55**(3): 365-376.
- Illes, Z., Safrany, E., Peterfalvi, A., Magyari, L., Farago, B., Pozsonyi, E., Rozsa, C., Komoly, S. and Melegh, B. (2008). "3'UTR C2370A allele of the IL-23 receptor gene is associated with relapsing-remitting multiple sclerosis." Neurosci.Lett. **431**(1): 36-38.
- Issazadeh, S., Ljungdahl, A., Hojeberg, B., Mustafa, M. and Olsson, T. (1995). "Cytokine production in the central nervous system of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis: dynamics of mRNA expression for interleukin-10, interleukin-12, cytolysin, tumor necrosis factor alpha and tumor necrosis factor beta." Journal of Neuroimmunology **61**(2): 205-212.
- Itano, A. A. and Jenkins, M. K. (2003). "Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node." Nature immunology **4**(8): 733-739.
- Ito, M., Nishikawa, M., Fujioka, M., Miyahara, M., Isaka, N., Shiku, H. and Nakano, T. (1996). "Characterization of the isoenzymes of cyclic nucleotide phosphodiesterase in human platelets and the effects of E4021." Cellular signalling **8**(8): 575-581.



- Iwami, G., Kawabe, J., Ebina, T., Cannon, P. J., Homcy, C. J. and Ishikawa, Y. (1995). "Regulation of adenylyl cyclase by protein kinase A." The Journal of biological chemistry **270**(21): 12481-12484.
- Jack, C. S., Arbour, N., Blain, M., Meier, U. C., Prat, A. and Antel, J. P. (2007). "Th1 polarization of CD4+ T cells by Toll-like receptor 3-activated human microglia." J.Neuropathol.Exp.Neurol. **66**(9): 848-859.
- Janeway, C. A., Jr. and Medzhitov, R. (2002). "Innate immune recognition." Annual review of immunology **20**: 197-216.
- Jeon, Y. H., Heo, Y. S., Kim, C. M., Hyun, Y. L., Lee, T. G., Ro, S. and Cho, J. M. (2005). "Phosphodiesterase: overview of protein structures, potential therapeutic applications and recent progress in drug development." Cell Mol.Life Sci. **62**(11): 1198-1220.
- Jin, S. L. and Conti, M. (2002). "Induction of the cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE4B is essential for LPS-activated TNF-alpha responses." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(11): 7628-7633.
- Jin, S. L., Goya, S., Nakae, S., Wang, D., Bruss, M., Hou, C., Umetsu, D. and Conti, M. (2010). "Phosphodiesterase 4B is essential for T(H)2-cell function and development of airway hyperresponsiveness in allergic asthma." The Journal of allergy and clinical immunology **126**(6): 1252-1259 e1212.
- Jin, S. L., Lan, L., Zoudilova, M. and Conti, M. (2005). "Specific role of phosphodiesterase 4B in lipopolysaccharide-induced signaling in mouse macrophages." J.Immunol. **175**(3): 1523-1531.
- Jin, S. L., Swinnen, J. V. and Conti, M. (1992). "Characterization of the structure of a low Km, rolipram-sensitive cAMP phosphodiesterase. Mapping of the catalytic domain." J Biol Chem **267**(26): 18929-18939.
- Jones, D. T. and Reed, R. R. (1989). "Golf: an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction." Science **244**(4906): 790-795.
- Kadoshima-Yamaoka, K., Murakawa, M., Goto, M., Tanaka, Y., Inoue, H., Murafuji, H., Hayashi, Y., Nagahira, K., Miura, K., Nakatsuka, T., Chamoto, K., Fukuda, Y. and Nishimura, T. (2009). "Effect of phosphodiesterase 7 inhibitor ASB16165 on development and function of cytotoxic T lymphocyte." International immunopharmacology **9**(1): 97-102.
- Kakalacheva, K., Munz, C. and Lunemann, J. D. (2011). "Viral triggers of multiple sclerosis." Biochimica et Biophysica Acta **1812**(2): 132-140.
- Kalamidas, S. A., Kuehnel, M. P., Peyron, P., Rybin, V., Rauch, S., Kotoulas, O. B., Houslay, M., Hemmings, B. A., Gutierrez, M. G., Anes, E. and Griffiths, G. (2006). "cAMP synthesis and degradation by phagosomes regulate actin assembly and fusion events: consequences for mycobacteria." Journal of cell science **119**(Pt 17): 3686-3694.
- Kamenetsky, M., Middelhaufe, S., Bank, E. M., Levin, L. R., Buck, J. and Steegborn, C. (2006). "Molecular details of cAMP generation in mammalian cells: a tale of two systems." Journal of molecular biology **362**(4): 623-639.
- Kammer, G. M. (1988). "The adenylate cyclase-cAMP-protein kinase A pathway and regulation of the immune response." Immunology today **9**(7-8): 222-229.

## Bibliografia

- Kang, B. Y., Kim, E. and Kim, T. S. (2005). "Regulatory mechanisms and their therapeutic implications of interleukin-12 production in immune cells." Cellular signalling **17**(6): 665-673.
- Kawakami, N., Nagerl, U. V., Odoardi, F., Bonhoeffer, T., Wekerle, H. and Flugel, A. (2005). "Live imaging of effector cell trafficking and autoantigen recognition within the unfolding autoimmune encephalomyelitis lesion." J.Exp.Med. **201**(11): 1805-1814.
- Kidd, P. (2003). "Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease." Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic **8**(3): 223-246.
- Kim, K. S., Kim, J., Back, S. K., Im, J. Y., Na, H. S. and Han, P. L. (2007). "Markedly attenuated acute and chronic pain responses in mice lacking adenylyl cyclase-5." Genes, brain, and behavior **6**(2): 120-127.
- Kim, K. S., Lee, K. W., Im, J. Y., Yoo, J. Y., Kim, S. W., Lee, J. K., Nestler, E. J. and Han, P. L. (2006). "Adenylyl cyclase type 5 (AC5) is an essential mediator of morphine action." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **103**(10): 3908-3913.
- Kim, S., Moon, C., Wie, M. B., Kim, H., Tanuma, N., Matsumoto, Y. and Shin, T. (2000). "Enhanced expression of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in autoimmune encephalomyelitis." J.Vet.Sci. **1**(1): 11-17.
- Kobayashi, T., Gamanuma, M., Sasaki, T., Yamashita, Y., Yuasa, K., Kotera, J. and Omori, K. (2003). "Molecular comparison of rat cyclic nucleotide phosphodiesterase 8 family: unique expression of PDE8B in rat brain." Gene **319**: 21-31.
- Korkmaz, S., Maupoil, V., Sobry, C., Brunet, C., Chevalier, S. and Freslon, J. L. (2009). "An increased regional blood flow precedes mesenteric inflammation in rats treated by a phosphodiesterase 4 inhibitor." Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology **107**(1): 298-305.
- Korn, T., Anderson, A. C., Bettelli, E. and Oukka, M. (2007). "The dynamics of effector T cells and Foxp3+ regulatory T cells in the promotion and regulation of autoimmune encephalomyelitis." J.Neuroimmunol. **191**(1-2): 51-60.
- Korn, T., Oukka, M., Kuchroo, V. and Bettelli, E. (2007). "Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties." Semin.Immunol. **19**(6): 362-371.
- Kornek, B., Storch, M. K., Weissert, R., Wallstroem, E., Stefferl, A., Olsson, T., Lington, C., Schmidbauer, M. and Lassmann, H. (2000). "Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions." The American journal of pathology **157**(1): 267-276.
- Kotera, J., Fujishige, K. and Omori, K. (2000). "Immunohistochemical localization of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in rat tissues." J.Histochem.Cytochem. **48**(5): 685-693.
- Krupinski, J., Coussen, F., Bakalyar, H. A., Tang, W. J., Feinstein, P. G., Orth, K., Slaughter, C., Reed, R. R. and Gilman, A. G. (1989). "Adenylyl cyclase amino acid sequence: possible channel- or transporter-like structure." Science **244**(4912): 1558-1564.
- Kuroda, Y. and Shimamoto, Y. (1991). "Human tumor necrosis factor-alpha augments experimental allergic encephalomyelitis in rats." Journal of Neuroimmunology **34**(2-3): 159-164.

- Lafaille, J. J., Nagashima, K., Katsuki, M. and Tonegawa, S. (1994). "High incidence of spontaneous autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice." *Cell* **78**(3): 399-408.
- Lai, H. L., Yang, T. H., Messing, R. O., Ching, Y. H., Lin, S. C. and Chern, Y. (1997). "Protein kinase C inhibits adenylyl cyclase type VI activity during desensitization of the A2a-adenosine receptor-mediated cAMP response." *The Journal of biological chemistry* **272**(8): 4970-4977.
- Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W. M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J. D., McClanahan, T., Kastelein, R. A. and Cua, D. J. (2005). "IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation." *J.Exp.Med.* **201**(2): 233-240.
- Lanzavecchia, A. and Sallusto, F. (2005). "Understanding the generation and function of memory T cell subsets." *Current opinion in immunology* **17**(3): 326-332.
- Lassmann, H., Bruck, W. and Lucchinetti, C. (2001). "Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy." *Trends Mol.Med.* **7**(3): 115-121.
- Lauer, K. (2010). "Environmental risk factors in multiple sclerosis." *Expert review of neurotherapeutics* **10**(3): 421-440.
- Leclerc, P., de Lamirande, E. and Gagnon, C. (1996). "Cyclic adenosine 3',5'monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility." *Biology of reproduction* **55**(3): 684-692.
- Lee, K. W., Hong, J. H., Choi, I. Y., Che, Y., Lee, J. K., Yang, S. D., Song, C. W., Kang, H. S., Lee, J. H., Noh, J. S., Shin, H. S. and Han, P. L. (2002). "Impaired D2 dopamine receptor function in mice lacking type 5 adenylyl cyclase." *J.Neurosci.* **22**(18): 7931-7940.
- Lee, R., Wolda, S., Moon, E., Esselstyn, J., Hertel, C. and Lerner, A. (2002). "PDE7A is expressed in human B-lymphocytes and is up-regulated by elevation of intracellular cAMP." *Cell Signal.* **14**(3): 277-284.
- Li, M. O., Wan, Y. Y., Sanjabi, S., Robertson, A. K. and Flavell, R. A. (2006). "Transforming growth factor-beta regulation of immune responses." *Annu.Rev.Immunol.* **24**: 99-146.
- Li, Y., Asuri, S., Rebhun, J. F., Castro, A. F., Paranaivitana, N. C. and Quilliam, L. A. (2006). "The RAP1 guanine nucleotide exchange factor Epac2 couples cyclic AMP and Ras signals at the plasma membrane." *The Journal of biological chemistry* **281**(5): 2506-2514.
- Li, Y., Ndubuka, C. and Rubin, C. S. (1996). "A kinase anchor protein 75 targets regulatory (RII) subunits of cAMP-dependent protein kinase II to the cortical actin cytoskeleton in non-neuronal cells." *The Journal of biological chemistry* **271**(28): 16862-16869.
- Li, Y. F., Cheng, Y. F., Huang, Y., Conti, M., Wilson, S. P., O'Donnell, J. M. and Zhang, H. T. (2011). "Phosphodiesterase-4D knock-out and RNA interference-mediated knock-down enhance memory and increase hippocampal neurogenesis via increased cAMP signaling." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **31**(1): 172-183.
- Lock, C., Hermans, G., Pedotti, R., Brendolan, A., Schadt, E., Garren, H., Langer-Gould, A., Strober, S., Cannella, B., Allard, J., Klonowski, P., Austin, A., Lad, N., Kaminski, N., Galli, S. J., Oksenberg, J. R., Raine, C. S., Heller, R. and Steinman, L. (2002). "Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis." *Nat.Med.* **8**(5): 500-508.

## Bibliografia

- London, C. A., Lodge, M. P. and Abbas, A. K. (2000). "Functional responses and costimulator dependence of memory CD4+ T cells." Journal of immunology **164**(1): 265-272.
- Loughney, K., Hill, T. R., Florio, V. A., Uher, L., Rosman, G. J., Wolda, S. L., Jones, B. A., Howard, M. L., McAllister-Lucas, L. M., Sonnenburg, W. K., Francis, S. H., Corbin, J. D., Beavo, J. A. and Ferguson, K. (1998). "Isolation and characterization of cDNAs encoding PDE5A, a human cGMP-binding, cGMP-specific 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase." Gene **216**(1): 139-147.
- Loughney, K., Snyder, P. B., Uher, L., Rosman, G. J., Ferguson, K. and Florio, V. A. (1999). "Isolation and characterization of PDE10A, a novel human 3', 5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase." Gene **234**(1): 109-117.
- Luo, M., Jones, S. M., Phare, S. M., Coffey, M. J., Peters-Golden, M. and Brock, T. G. (2004). "Protein kinase A inhibits leukotriene synthesis by phosphorylation of 5-lipoxygenase on serine 523." The Journal of biological chemistry **279**(40): 41512-41520.
- Luttrell, L. M. and Lefkowitz, R. J. (2002). "The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals." Journal of cell science **115**(Pt 3): 455-465.
- MacKenzie, S. J., Baillie, G. S., McPhee, I., MacKenzie, C., Seamons, R., McSorley, T., Millen, J., Beard, M. B., van Heeke, G. and Houslay, M. D. (2002). "Long PDE4 cAMP specific phosphodiesterases are activated by protein kinase A-mediated phosphorylation of a single serine residue in Upstream Conserved Region 1 (UCR1)." British Journal of Pharmacology **136**(3): 421-433.
- Makranz, C., Cohen, G., Reichert, F., Kodama, T. and Rotshenker, S. (2006). "cAMP cascade (PKA, Epac, adenylyl cyclase, Gi, and phosphodiesterases) regulates myelin phagocytosis mediated by complement receptor-3 and scavenger receptor-AI/II in microglia and macrophages." Glia **53**(4): 441-448.
- Manel, N., Unutmaz, D. and Littman, D. R. (2008). "The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma." Nat.Immunol. **9**(6): 641-649.
- Mangan, P. R., Harrington, L. E., O'Quinn, D. B., Helms, W. S., Bullard, D. C., Elson, C. O., Hatton, R. D., Wahl, S. M., Schoeb, T. R. and Weaver, C. T. (2006). "Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage." Nature **441**(7090): 231-234.
- Mansour, A., Fox, C. A., Burke, S., Meng, F., Thompson, R. C., Akil, H. and Watson, S. J. (1994). "Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study." The Journal of comparative neurology **350**(3): 412-438.
- Marta, M., Andersson, A., Isaksson, M., Kampe, O. and Lobell, A. (2008). "Unexpected regulatory roles of TLR4 and TLR9 in experimental autoimmune encephalomyelitis." Eur.J.Immunol. **38**(2): 565-575.
- Martins, T. J., Mumby, M. C. and Beavo, J. A. (1982). "Purification and characterization of a cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase from bovine tissues." J.Biol.Chem. **257**(4): 1973-1979.
- Matyszak, M. K. and Perry, V. H. (1996). "The potential role of dendritic cells in immune-mediated inflammatory diseases in the central nervous system." Neuroscience **74**(2): 599-608.

- Maurice, D. H. and Haslam, R. J. (1990). "Molecular basis of the synergistic inhibition of platelet function by nitrovasodilators and activators of adenylate cyclase: inhibition of cyclic AMP breakdown by cyclic GMP." Mol.Pharmacol. **37**(5): 671-681.
- McFarlin, D. E., Blank, S. E. and Kibler, R. F. (1974). "Recurrent experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat2." J.Immunol. **113**(2): 712-715.
- McGeachy, M. J., Stephens, L. A. and Anderton, S. M. (2005). "Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system." Journal of immunology **175**(5): 3025-3032.
- McKenna, S. D., Pietropaolo, M., Tos, E. G., Clark, A., Fischer, D., Kagan, D., Bao, B., Chedrese, P. J. and Palmer, S. (2005). "Pharmacological inhibition of phosphodiesterase 4 triggers ovulation in follicle-stimulating hormone-primed rats." Endocrinology **146**(1): 208-214.
- McLaughlin, M. E., Sandberg, M. A., Berson, E. L. and Dryja, T. P. (1993). "Recessive mutations in the gene encoding the beta-subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa." Nat.Genet. **4**(2): 130-134.
- McRae, B. L., Kennedy, M. K., Tan, L. J., Dal Canto, M. C., Picha, K. S. and Miller, S. D. (1992). "Induction of active and adoptive relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) using an encephalitogenic epitope of proteolipid protein." J.Neuroimmunol. **38**(3): 229-240.
- Mendel, I., Kerlero de Rosbo, N. and Ben-Nun, A. (1995). "A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells." European journal of immunology **25**(7): 1951-1959.
- Monney, L., Sabatos, C. A., Gaglia, J. L., Ryu, A., Waldner, H., Chernova, T., Manning, S., Greenfield, E. A., Coyle, A. J., Sobel, R. A., Freeman, G. J. and Kuchroo, V. K. (2002). "Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease." Nature **415**(6871): 536-541.
- Moore, C. S., Earl, N., Frenette, R., Styhler, A., Mancini, J. A., Nicholson, D. W., Hebb, A. L., Owens, T. and Robertson, G. S. (2006). "Peripheral phosphodiesterase 4 inhibition produced by 4-[2-(3,4-Bis-difluoromethoxyphenyl)-2-[4-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-hydrox ypropan-2-yl)-phenyl]-ethyl]-3-methylpyridine-1-oxide (L-826,141) prevents experimental autoimmune encephalomyelitis." J.Pharmacol.Exp.Ther. **319**(1): 63-72.
- Morin, F., Lugnier, C., Kameni, J. and Voisin, P. (2001). "Expression and role of phosphodiesterase 6 in the chicken pineal gland." Journal of Neurochemistry **78**(1): 88-99.
- Mosmann, T. R. and Coffman, R. L. (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." Annu.Rev.Immunol. **7**: 145-173.
- Mullershausen, F., Lange, A., Mergia, E., Friebe, A. and Koesling, D. (2006). "Desensitization of NO/cGMP signaling in smooth muscle: blood vessels versus airways." Molecular pharmacology **69**(6): 1969-1974.
- Nagel, D. J., Aizawa, T., Jeon, K. I., Liu, W., Mohan, A., Wei, H., Miano, J. M., Florio, V. A., Gao, P., Korshunov, V. A., Berk, B. C. and Yan, C. (2006). "Role of nuclear Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-stimulated phosphodiesterase 1A in vascular smooth muscle cell growth and survival." Circulation research **98**(6): 777-784.



## Bibliografia

Nakata, A., Ogawa, K., Sasaki, T., Koyama, N., Wada, K., Kotera, J., Kikkawa, H., Omori, K. and Kaminuma, O. (2002). "Potential role of phosphodiesterase 7 in human T cell function: comparative effects of two phosphodiesterase inhibitors." Clin.Exp.Immunol. **128**(3): 460-466.

Nestler, E. J. and Aghajanian, G. K. (1997). "Molecular and cellular basis of addiction." Science **278**(5335): 58-63.

Neves, S. R., Ram, P. T. and Iyengar, R. (2002). "G protein pathways." Science **296**(5573): 1636-1639.

Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F. and Helmchen, F. (2005). "Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo." Science **308**(5726): 1314-1318.

Nogueira-Machado, J. A., Lima e Silva, F. C., Cunha, E. P., Calsolari, M. R., Costa, D. C., Perilo, C. S., Horta, B. C., Ferreira, I. C. and Chaves, M. M. (2006). "Modulation of the production of reactive oxygen species (ROS) by cAMP-elevating agents in granulocytes from diabetic patients: an Akt/PKB-dependent phenomenon." Diabetes & metabolism **32**(4): 331-335.

Noseworthy, J. H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M. and Weinshenker, B. G. (2000). "Multiple sclerosis." The New England journal of medicine **343**(13): 938-952.

Oki, N., Takahashi, S. I., Hidaka, H. and Conti, M. (2000). "Short term feedback regulation of cAMP in FRTL-5 thyroid cells. Role of PDE4D3 phosphodiesterase activation." The Journal of biological chemistry **275**(15): 10831-10837.

Oksenberg, J. R. and Baranzini, S. E. (2010). "Multiple sclerosis genetics--is the glass half full, or half empty?" Nature reviews. Neurology **6**(8): 429-437.

Okumura, S., Kawabe, J., Yatani, A., Takagi, G., Lee, M. C., Hong, C., Liu, J., Takagi, I., Sadoshima, J., Vatner, D. E., Vatner, S. F. and Ishikawa, Y. (2003). "Type 5 adenylyl cyclase disruption alters not only sympathetic but also parasympathetic and calcium-mediated cardiac regulation." Circulation research **93**(4): 364-371.

Ono, S. J., Nakamura, T., Miyazaki, D., Ohbayashi, M., Dawson, M. and Toda, M. (2003). "Chemokines: roles in leukocyte development, trafficking, and effector function." The Journal of allergy and clinical immunology **111**(6): 1185-1199; quiz 1200.

Ozato, K., Tsujimura, H. and Tamura, T. (2002). "Toll-like receptor signaling and regulation of cytokine gene expression in the immune system." Biotechniques Suppl: 66-68, 70, 72 passim.

Ozdemir, C., Akdis, M. and Akdis, C. A. (2010). "T-cell response to allergens." Chemical immunology and allergy **95**: 22-44.

PÇrez-Torres, S., Mirç, X., Palacios, J. M., CortÇs, R., PuigdomÇnech, P. and Mengod, G. (2000). "Phosphodiesterase type 4 isozymes expression in human brain examined by in situ hybridization histochemistry and[3H]rolipram binding autoradiography. Comparison with monkey and rat brain." Journal of Chemical Neuroanatomy **20**: 349-374.

Perry, S. J., Baillie, G. S., Kohout, T. A., McPhee, I., Magiera, M. M., Ang, K. L., Miller, W. E., McLean, A. J., Conti, M., Houslay, M. D. and Lefkowitz, R. J. (2002). "Targeting of cyclic AMP degradation to beta 2-adrenergic receptors by beta-arrestins." Science **298**(5594): 834-836.

Peter, D., Jin, S. L., Conti, M., Hatzelmann, A. and Zitt, C. (2007). "Differential expression and function of phosphodiesterase 4 (PDE4) subtypes in human primary CD4+ T cells: predominant role of PDE4D." Journal of immunology **178**(8): 4820-4831.

Peterson, J. W., Bo, L., Mork, S., Chang, A. and Trapp, B. D. (2001). "Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions." Annals of Neurology **50**(3): 389-400.

Petzold, A., Gveric, D., Groves, M., Schmierer, K., Grant, D., Chapman, M., Keir, G., Cuzner, L. and Thompson, E. J. (2008). "Phosphorylation and compactness of neurofilaments in multiple sclerosis: indicators of axonal pathology." Experimental neurology **213**(2): 326-335.

Piccart, E., Gantois, I., Laeremans, A., de Hoogt, R., Meert, T., Vanhoof, G., Arckens, L. and D'Hooge, R. (2011). "Impaired appetitively as well as aversively motivated behaviors and learning in PDE10A-deficient mice suggest a role for striatal signaling in evaluative salience attribution." Neurobiology of learning and memory **95**(3): 260-269.

Pierre, S., Eschenhagen, T., Geisslinger, G. and Scholich, K. (2009). "Capturing adenylyl cyclases as potential drug targets." Nat.Rev.Drug Discov. **8**(4): 321-335.

Platzer, C., Meisel, C., Vogt, K., Platzer, M. and Volk, H. D. (1995). "Up-regulation of monocytic IL-10 by tumor necrosis factor-alpha and cAMP elevating drugs." Int.Immunol. **7**(4): 517-523.

Prinz, M., Garbe, F., Schmidt, H., Mildner, A., Gutcher, I., Wolter, K., Piesche, M., Schroers, R., Weiss, E., Kirschning, C. J., Rochford, C. D., Bruck, W. and Becher, B. (2006). "Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis." J.Clin.Invest **116**(2): 456-464.

Probert, L., Eugster, H. P., Akassoglou, K., Bauer, J., Frei, K., Lassmann, H. and Fontana, A. (2000). "TNFR1 signalling is critical for the development of demyelination and the limitation of T-cell responses during immune-mediated CNS disease." Brain **123 ( Pt 10)**: 2005-2019.

Probert, L., Eugster, H. P., Akassoglou, K., Bauer, J., Frei, K., Lassmann, H. and Fontana, A. (2000). "TNFR1 signalling is critical for the development of demyelination and the limitation of T-cell responses during immune-mediated CNS disease." Brain : a journal of neurology **123 ( Pt 10)**: 2005-2019.

Raivich, G. and Banati, R. (2004). "Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease." Brain Res.Brain Res.Rev. **46**(3): 261-281.

Rall, T. W., Wosilait, W. D. and Sutherland, E. W. (1956). "The interconversion of phosphorylase a and phosphorylase b from dog heart muscle." Biochimica et Biophysica Acta **20**(1): 69-76.

Rangarajan, S., Enserink, J. M., Kuiperij, H. B., de Rooij, J., Price, L. S., Schwede, F. and Bos, J. L. (2003). "Cyclic AMP induces integrin-mediated cell adhesion through Epac and Rap1 upon stimulation of the beta 2-adrenergic receptor." The Journal of cell biology **160**(4): 487-493.

Recks, M. S., Addicks, K. and Kuerten, S. (2011). "Spinal cord histopathology of MOG peptide 35-55-induced experimental autoimmune encephalomyelitis is time- and score-dependent." Neuroscience letters.

Reddy, J., Illes, Z., Zhang, X., Encinas, J., Pyrdol, J., Nicholson, L., Sobel, R. A., Wucherpfennig, K. W. and Kuchroo, V. K. (2004). "Myelin proteolipid protein-specific CD4+CD25+ regulatory cells



## Bibliografia

- mediate genetic resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **101**(43): 15434-15439.
- Reed, T. M., Repaske, D. R., Snyder, G. L., Greengard, P. and Vorhees, C. V. (2002). "Phosphodiesterase 1B knock-out mice exhibit exaggerated locomotor hyperactivity and DARPP-32 phosphorylation in response to dopamine agonists and display impaired spatial learning." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **22**(12): 5188-5197.
- Renno, T., Taupin, V., Bourbonniere, L., Verge, G., Tran, E., De Simone, R., Krakowski, M., Rodriguez, M., Peterson, A. and Owens, T. (1998). "Interferon-gamma in progression to chronic demyelination and neurological deficit following acute EAE." Molecular and cellular neurosciences **12**(6): 376-389.
- Reyes-Irisarri, E., Sanchez, A. J., Garcia-Merino, J. A. and Mengod, G. (2007). "Selective induction of cAMP phosphodiesterase PDE4132 expression in experimental autoimmune encephalomyelitis." Journal of Neuropathology and Experimental Neurology **66**(10): 923-931.
- Richard, F. J., Tsafiri, A. and Conti, M. (2001). "Role of phosphodiesterase type 3A in rat oocyte maturation." Biology of reproduction **65**(5): 1444-1451.
- Ridge, K. D., Abdulaev, N. G., Sousa, M. and Palczewski, K. (2003). "Phototransduction: crystal clear." Trends Biochem.Sci. **28**(9): 479-487.
- Rivest, S. (2003). "Molecular insights on the cerebral innate immune system." Brain, behavior, and immunity **17**(1): 13-19.
- Rutten, K., Vente, J. D., Sik, A., Ittersum, M. M., Prickaerts, J. and Blokland, A. (2005). "The selective PDE5 inhibitor, sildenafil, improves object memory in Swiss mice and increases cGMP levels in hippocampal slices." Behavioural brain research **164**(1): 11-16.
- Sanabra, C. and Mengod, G. (2011). "Neuroanatomical distribution and neurochemical characterization of cells expressing adenylyl cyclase isoforms in mouse and rat brain." Journal of Chemical Neuroanatomy **41**(1): 43-54.
- Sanz, M. J., Cortijo, J., Taha, M. A., Cerda-Nicolas, M., Schatton, E., Burgbacher, B., Klar, J., Tenor, H., Schudt, C., Issekutz, A. C., Hatzelmann, A. and Morcillo, E. J. (2007). "Roflumilast inhibits leukocyte-endothelial cell interactions, expression of adhesion molecules and microvascular permeability." British Journal of Pharmacology **152**(4): 481-492.
- Sasaki, T., Kotera, J. and Omori, K. (2002). "Novel alternative splice variants of rat phosphodiesterase 7B showing unique tissue-specific expression and phosphorylation." Biochem.J. **361**(Pt 2): 211-220.
- Schaefer, M. L., Wong, S. T., Wozniak, D. F., Muglia, L. M., Liauw, J. A., Zhuo, M., Nardi, A., Hartman, R. E., Vogt, S. K., Luedke, C. E., Storm, D. R. and Muglia, L. J. (2000). "Altered stress-induced anxiety in adenylyl cyclase type VIII-deficient mice." J.Neurosci. **20**(13): 4809-4820.
- Schmidt, M., Evellin, S., Weernink, P. A., von Dorp, F., Rehmann, H., Lomasney, J. W. and Jakobs, K. H. (2001). "A new phospholipase-C-calcium signalling pathway mediated by cyclic AMP and a Rap GTPase." Nature cell biology **3**(11): 1020-1024.
- Schnare, M., Barton, G. M., Holt, A. C., Takeda, K., Akira, S. and Medzhitov, R. (2001). "Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses." Nat.Immunol. **2**(10): 947-950.

- Schubert, L. A., Jeffery, E., Zhang, Y., Ramsdell, F. and Ziegler, S. F. (2001). "Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation." *J.Biol.Chem.* **276**(40): 37672-37679.
- Seldon, P. M., Barnes, P. J., Meja, K. and Giembycz, M. A. (1995). "Suppression of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha generation from human peripheral blood monocytes by inhibitors of phosphodiesterase 4: interaction with stimulants of adenylyl cyclase." *Mol.Pharmacol* **48**(4): 747-757.
- Serafini, B., Columba-Cabezas, S., Di Rosa, F. and Aloisi, F. (2000). "Intracerebral recruitment and maturation of dendritic cells in the onset and progression of experimental autoimmune encephalomyelitis." *Am.J.Pathol.* **157**(6): 1991-2002.
- Serafini, B., Rosicarelli, B., Magliozzi, R., Stigliano, E., Capello, E., Mancardi, G. L. and Aloisi, F. (2006). "Dendritic cells in multiple sclerosis lesions: maturation stage, myelin uptake, and interaction with proliferating T cells." *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* **65**(2): 124-141.
- Sette, C. and Conti, M. (1996). "Phosphorylation and activation of a cAMP-specific phosphodiesterase by the cAMP-dependent protein kinase. Involvement of serine 54 in the enzyme activation." *The Journal of biological chemistry* **271**(28): 16526-16534.
- Seybold, J., Thomas, D., Witzenrath, M., Boral, S., Hocke, A. C., Burger, A., Hatzelmann, A., Tenor, H., Schudt, C., Krull, M., Schutte, H., Hippenstiel, S. and Suttorp, N. (2005). "Tumor necrosis factor-alpha-dependent expression of phosphodiesterase 2: role in endothelial hyperpermeability." *Blood* **105**(9): 3569-3576.
- Shakur, Y., Holst, L. S., Landstrom, T. R., Movsesian, M., Degerman, E. and Manganiello, V. (2001). "Regulation and function of the cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE3) gene family." *Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.* **66**: 241-277.
- Shepherd, M. C., Baillie, G. S., Stirling, D. I. and Houslay, M. D. (2004). "Remodelling of the PDE4 cAMP phosphodiesterase isoform profile upon monocyte-macrophage differentiation of human U937 cells." *British Journal of Pharmacology* **142**(2): 339-351.
- Shichijo, M., Inagaki, N., Kimata, M., Serizawa, I., Saito, H. and Nagai, H. (1999). "Role of cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate in the regulation of chemical mediator release and cytokine production from cultured human mast cells." *The Journal of allergy and clinical immunology* **103**(5 Pt 2): S421-428.
- Shirota, H., Sano, K., Hirasawa, N., Terui, T., Ohuchi, K., Hattori, T. and Tamura, G. (2002). "B cells capturing antigen conjugated with CpG oligodeoxynucleotides induce Th1 cells by elaborating IL-12." *Journal of immunology* **169**(2): 787-794.
- Silva, A. J., Kogan, J. H., Frankland, P. W. and Kida, S. (1998). "CREB and memory." *Annual review of neuroscience* **21**: 127-148.
- Smith, S. J., Brookes-Fazakerley, S., Donnelly, L. E., Barnes, P. J., Barnette, M. S. and Giembycz, M. A. (2003). "Ubiquitous expression of phosphodiesterase 7A in human proinflammatory and immune cells." *Am.J Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **284**(2): L279-L289.
- Smith, S. J., Cieslinski, L. B., Newton, R., Donnelly, L. E., Fenwick, P. S., Nicholson, A. G., Barnes, P. J., Barnette, M. S. and Giembycz, M. A. (2004). "Discovery of BRL 50481 [3-(N,N-dimethylsulfonamido)-4-methyl-nitrobenzene], a selective inhibitor of phosphodiesterase 7: in vitro studies in human monocytes, lung macrophages, and CD8+ T-lymphocytes." *Mol.Pharmacol.* **66**(6): 1679-1689.

## Bibliografia

- Soderling, S. H., Bayuga, S. J. and Beavo, J. A. (1999). "Isolation and characterization of a dual-substrate phosphodiesterase gene family: PDE10A." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **96**(12): 7071-7076.
- Somekawa, S., Fukuhara, S., Nakaoka, Y., Fujita, H., Saito, Y. and Mochizuki, N. (2005). "Enhanced functional gap junction neofunction by protein kinase A-dependent and Epac-dependent signals downstream of cAMP in cardiac myocytes." Circulation research **97**(7): 655-662.
- Sommer, N., Loschmann, P. A., Northoff, G. H., Weller, M., Steinbrecher, A., Steinbach, J. P., Lichtenfels, R., Meyermann, R., Riethmuller, A., Fontana, A., Dighans, J. and Martin, R. (1995). "The antidepressant rolipram suppresses cytokine production and prevents autoimmune encephalomyelitis." Nat Med **1**(3): 244-248.
- Sospedra, M. and Martin, R. (2005). "Immunology of multiple sclerosis." Annu.Rev.Immunol. **23**: 683-747.
- Soulika, A. M., Lee, E., McCauley, E., Miers, L., Bannerman, P. and Pleasure, D. (2009). "Initiation and progression of axonopathy in experimental autoimmune encephalomyelitis." J.Neurosci. **29**(47): 14965-14979.
- Spina, D. (2008). "PDE4 inhibitors: current status." British Journal of Pharmacology **155**(3): 308-315.
- Steadman, R., Petersen, M. M. and Williams, J. D. (1996). "Human neutrophil secondary granule exocytosis is independent of protein kinase activation and is modified by calmodulin activity." The international journal of biochemistry & cell biology **28**(7): 777-786.
- Steinman, L. (2003). "Optic neuritis, a new variant of experimental encephalomyelitis, a durable model for all seasons, now in its seventieth year." The Journal of experimental medicine **197**(9): 1065-1071.
- Storm, D. R., Hansel, C., Hacker, B., Parent, A. and Linden, D. J. (1998). "Impaired cerebellar long-term potentiation in type I adenylyl cyclase mutant mice." Neuron **20**(6): 1199-1210.
- Stryer, L. (1996). "Vision: from photon to perception." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **93**(2): 557-559.
- Sun, B., Li, H., Shakur, Y., Hensley, J., Hockman, S., Kambayashi, J., Manganiello, V. C. and Liu, Y. (2007). "Role of phosphodiesterase type 3A and 3B in regulating platelet and cardiac function using subtype-selective knockout mice." Cellular signalling **19**(8): 1765-1771.
- Sutherland, E. W. and Rall, T. W. (1958). "Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles." The Journal of biological chemistry **232**(2): 1077-1091.
- Tabakoff, B., Hoffman, P. L., Lee, J. M., Saito, T., Willard, B. and De Leon-Jones, F. (1988). "Differences in platelet enzyme activity between alcoholics and nonalcoholics." The New England journal of medicine **318**(3): 134-139.
- Takahashi, J. L., Giuliani, F., Power, C., Imai, Y. and Yong, V. W. (2003). "Interleukin-1beta promotes oligodendrocyte death through glutamate excitotoxicity." Annals of Neurology **53**(5): 588-595.
- Takahashi, N., Tetsuka, T., Uranishi, H. and Okamoto, T. (2002). "Inhibition of the NF-kappaB transcriptional activity by protein kinase A." Eur J Biochem **269**(18): 4559-4565.

- Takeuchi, H., Jin, S., Wang, J., Zhang, G., Kawanokuchi, J., Kuno, R., Sonobe, Y., Mizuno, T. and Suzumura, A. (2006). "Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner." The Journal of biological chemistry **281**(30): 21362-21368.
- Tang, T., Gao, M. H., Lai, N. C., Firth, A. L., Takahashi, T., Guo, T., Yuan, J. X., Roth, D. M. and Hammond, H. K. (2008). "Adenylyl cyclase type 6 deletion decreases left ventricular function via impaired calcium handling." Circulation **117**(1): 61-69.
- Tasken, K. and Aandahl, E. M. (2004). "Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A." Physiological reviews **84**(1): 137-167.
- Tasken, K. and Stokka, A. J. (2006). "The molecular machinery for cAMP-dependent immunomodulation in T-cells." Biochem.Soc.Trans. **34**(Pt 4): 476-479.
- Tasken, K. A., Collas, P., Kemmner, W. A., Witczak, O., Conti, M. and Tasken, K. (2001). "Phosphodiesterase 4D and protein kinase a type II constitute a signaling unit in the centrosomal area." The Journal of biological chemistry **276**(25): 21999-22002.
- Thierfelder, W. E., van Deursen, J. M., Yamamoto, K., Tripp, R. A., Sarawar, S. R., Carson, R. T., Sangster, M. Y., Vignali, D. A., Doherty, P. C., Grosveld, G. C. and Ihle, J. N. (1996). "Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells." Nature **382**(6587): 171-174.
- Thompson, W. J., Terasaki, W. L., Epstein, P. M. and Strada, S. J. (1979). "Assay of cyclic nucleotide phosphodiesterase and resolution of multiple molecular forms of the enzyme." Adv.Cyclic.Nucleotide.Res. **10**: 69-92.
- Tilley, D. G. and Maurice, D. H. (2002). "Vascular smooth muscle cell phosphodiesterase (PDE) 3 and PDE4 activities and levels are regulated by cyclic AMP in vivo." Molecular pharmacology **62**(3): 497-506.
- Torgersen, K. M., Vang, T., Abrahamsen, H., Yaqub, S. and Tasken, K. (2002). "Molecular mechanisms for protein kinase A-mediated modulation of immune function." Cellular signalling **14**(1): 1-9.
- Torphy, T. J. (1998). "Phosphodiesterase isozymes: molecular targets for novel antiasthma agents." Am J Respir Crit Care Med **157**(2): 351-370.
- Tran, E. H., Hoekstra, K., van Rooijen, N., Dijkstra, C. D. and Owens, T. (1998). "Immune invasion of the central nervous system parenchyma and experimental allergic encephalomyelitis, but not leukocyte extravasation from blood, are prevented in macrophage-depleted mice." J.Immunol. **161**(7): 3767-3775.
- Tzartos, J. S., Friese, M. A., Craner, M. J., Palace, J., Newcombe, J., Esiri, M. M. and Fugger, L. (2008). "Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis." Am.J.Pathol. **172**(1): 146-155.
- Underhill, D. M., Bassetti, M., Rudensky, A. and Aderem, A. (1999). "Dynamic interactions of macrophages with T cells during antigen presentation." The Journal of experimental medicine **190**(12): 1909-1914.

## Bibliografia

- van der Pouw Kraan, T. C., Boeije, L. C., Smeenk, R. J., Wijdenes, J. and Aarden, L. A. (1995). "Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production." The Journal of experimental medicine **181**(2): 775-779.
- van Staveren, W. C., Glick, J., Markerink-van Ittersum, M., Shimizu, M., Beavo, J. A., Steinbusch, H. W. and de Vente, J. (2002). "Cloning and localization of the cGMP-specific phosphodiesterase type 9 in the rat brain." J.Neurocytol. **31**(8-9): 729-741.
- Vandeput, F., Wolda, S. L., Krall, J., Hambleton, R., Uher, L., McCaw, K. N., Radwanski, P. B., Florio, V. and Movsesian, M. A. (2007). "Cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE1C1 in human cardiac myocytes." The Journal of biological chemistry **282**(45): 32749-32757.
- Vang, A. G., Ben-Sasson, S. Z., Dong, H., Kream, B., DeNinno, M. P., Claffey, M. M., Housley, W., Clark, R. B., Epstein, P. M. and Brocke, S. (2010). "PDE8 regulates rapid Teff cell adhesion and proliferation independent of ICER." PLoS One **5**(8): e12011.
- Vasta, V., Shimizu-Albergine, M. and Beavo, J. A. (2006). "Modulation of Leydig cell function by cyclic nucleotide phosphodiesterase 8A." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**(52): 19925-19930.
- Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M. and Stockinger, B. (2006). "TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells." Immunity. **24**(2): 179-189.
- Venters, H. D., Dantzer, R. and Kelley, K. W. (2000). "Tumor necrosis factor-alpha induces neuronal death by silencing survival signals generated by the type I insulin-like growth factor receptor." Annals of the New York Academy of Sciences **917**: 210-220.
- Verde, I., Vandecasteele, G., Lezoualc'h, F. and Fischmeister, R. (1999). "Characterization of the cyclic nucleotide phosphodiesterase subtypes involved in the regulation of the L-type Ca<sup>2+</sup> current in rat ventricular myocytes." British Journal of Pharmacology **127**(1): 65-74.
- Vilaro, M. T., Wiederhold, K. H., Palacios, J. M. and Mengod, G. (1992). "Muscarinic M2-selective ligands also recognize M4 receptors in the rat brain: evidence from combined in situ hybridization and receptor autoradiography." Synapse **11**(3): 171-183.
- Vogt, J., Paul, F., Aktas, O., Muller-Wielsch, K., Dorr, J., Dorr, S., Bharathi, B. S., Glumm, R., Schmitz, C., Steinbusch, H., Raine, C. S., Tsokos, M., Nitsch, R. and Zipp, F. (2009). "Lower motor neuron loss in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis." Annals of Neurology **66**(3): 310-322.
- Volpe, E., Servant, N., Zollinger, R., Bogiatzi, S. I., Hupe, P., Barillot, E. and Soumelis, V. (2008). "A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses." Nat.Immunol. **9**(6): 650-657.
- von Andrian, U. H. and Mempel, T. R. (2003). "Homing and cellular traffic in lymph nodes." Nature reviews. Immunology **3**(11): 867-878.
- Voskuhl, R. R., Peterson, R. S., Song, B., Ao, Y., Morales, L. B., Tiwari-Woodruff, S. and Sofroniew, M. V. (2009). "Reactive astrocytes form scar-like perivascular barriers to leukocytes during adaptive immune inflammation of the CNS." J.Neurosci. **29**(37): 11511-11522.



- Wang, D., Ayers, M. M., Catmull, D. V., Hazelwood, L. J., Bernard, C. C. and Orian, J. M. (2005). "Astrocyte-associated axonal damage in pre-onset stages of experimental autoimmune encephalomyelitis." Glia **51**(3): 235-240.
- Wang, H., Ferguson, G. D., Pineda, V. V., Cundiff, P. E. and Storm, D. R. (2004). "Overexpression of type-1 adenylyl cyclase in mouse forebrain enhances recognition memory and LTP." Nature neuroscience **7**(6): 635-642.
- Wang, H., Gong, B., Vadakkan, K. I., Toyoda, H., Kaang, B. K. and Zhuo, M. (2007). "Genetic evidence for adenylyl cyclase 1 as a target for preventing neuronal excitotoxicity mediated by N-methyl-D-aspartate receptors." The Journal of biological chemistry **282**(2): 1507-1517.
- Wang, H., Lee, Y. and Malbon, C. C. (2004). "PDE6 is an effector for the Wnt/Ca<sup>2+</sup>/cGMP-signalling pathway in development." Biochem.Soc.Trans. **32**(Pt 5): 792-796.
- Wang, P., Wu, P., Egan, R. W. and Billah, M. M. (2001). "Human phosphodiesterase 8A splice variants: cloning, gene organization, and tissue distribution." Gene **280**(1-2): 183-194.
- Wang, P., Wu, P., Egan, R. W. and Billah, M. M. (2003). "Identification and characterization of a new human type 9 cGMP-specific phosphodiesterase splice variant (PDE9A5). Differential tissue distribution and subcellular localization of PDE9A variants." Gene **314**: 15-27.
- Wang, Z., Dillon, T. J., Pokala, V., Mishra, S., Labudda, K., Hunter, B. and Stork, P. J. (2006). "Rap1-mediated activation of extracellular signal-regulated kinases by cyclic AMP is dependent on the mode of Rap1 activation." Molecular and cellular biology **26**(6): 2130-2145.
- Watford, W. T., Moriguchi, M., Morinobu, A. and O'Shea, J. J. (2003). "The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses." Cytokine & growth factor reviews **14**(5): 361-368.
- Wayman, C., Phillips, S., Lunny, C., Webb, T., Fawcett, L., Baxendale, R. and Burgess, G. (2005). "Phosphodiesterase 11 (PDE11) regulation of spermatozoa physiology." International journal of impotence research **17**(3): 216-223.
- Wayman, G. A., Wei, J., Wong, S. and Storm, D. R. (1996). "Regulation of type I adenylyl cyclase by calmodulin kinase IV in vivo." Molecular and cellular biology **16**(11): 6075-6082.
- Wechsler, J., Choi, Y. H., Krall, J., Ahmad, F., Manganiello, V. C. and Movsesian, M. A. (2002). "Isoforms of cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE3A in cardiac myocytes." J.Biol.Chem. **277**(41): 38072-38078.
- Wei, J., Wayman, G. and Storm, D. R. (1996). "Phosphorylation and inhibition of type III adenylyl cyclase by calmodulin-dependent protein kinase II in vivo." The Journal of biological chemistry **271**(39): 24231-24235.
- Weir, C. R., Nicolson, K. and Backstrom, B. T. (2002). "Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in naive mice by dendritic cells presenting a self-peptide." Immunol.Cell Biol. **80**(1): 14-20.
- Wekerle, H., Kojima, K., Lannes-Vieira, J., Lassmann, H. and Linington, C. (1994). "Animal models." Ann.Neurol. **36** Suppl: S47-S53.

## Bibliografia

- Wettschureck, N. and Offermanns, S. (2005). "Mammalian G proteins and their cell type specific functions." Physiological reviews **85**(4): 1159-1204.
- Whartenby, K. A., Calabresi, P. A., McCadden, E., Nguyen, B., Kardian, D., Wang, T., Mosse, C., Pardoll, D. M. and Small, D. (2005). "Inhibition of FLT3 signaling targets DCs to ameliorate autoimmune disease." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **102**(46): 16741-16746.
- Willenborg, D. O., Staykova, M., Fordham, S., O'Brien, N. and Linares, D. (2007). "The contribution of nitric oxide and interferon gamma to the regulation of the neuro-inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis." J.Neuroimmunol. **191**(1-2): 16-25.
- Willoughby, D. and Cooper, D. M. (2007). "Organization and Ca<sup>2+</sup> regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains." Physiological reviews **87**(3): 965-1010.
- Wilson, N. J., Boniface, K., Chan, J. R., McKenzie, B. S., Blumenschein, W. M., Mattson, J. D., Basham, B., Smith, K., Chen, T., Morel, F., Lecron, J. C., Kastelein, R. A., Cua, D. J., McClanahan, T. K., Bowman, E. P. and de Waal, M. R. (2007). "Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells." Nat.Immunol. **8**(9): 950-957.
- Wong, S. T., Trinh, K., Hacker, B., Chan, G. C., Lowe, G., Gaggar, A., Xia, Z., Gold, G. H. and Storm, D. R. (2000). "Disruption of the type III adenylyl cyclase gene leads to peripheral and behavioral anosmia in transgenic mice." Neuron **27**(3): 487-497.
- Wu, Z. L., Thomas, S. A., Villacres, E. C., Xia, Z., Simmons, M. L., Chavkin, C., Palmiter, R. D. and Storm, D. R. (1995). "Altered behavior and long-term potentiation in type I adenylyl cyclase mutant mice." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **92**(1): 220-224.
- Xia, Z. G., Refsdal, C. D., Merchant, K. M., Dorsa, D. M. and Storm, D. R. (1991). "Distribution of mRNA for the calmodulin-sensitive adenylate cyclase in rat brain: expression in areas associated with learning and memory." Neuron **6**(3): 431-443.
- Yamamoto, T., Manganiello, V. C. and Vaughan, M. (1983). "Purification and characterization of cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase from calf liver. Effects of divalent cations on activity." J.Biol.Chem. **258**(20): 12526-12533.
- Yan, C., Zhao, A. Z., Bentley, J. K., Loughney, K., Ferguson, K. and Beavo, J. A. (1995). "Molecular cloning and characterization of a calmodulin-dependent phosphodiesterase enriched in olfactory sensory neurons." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **92**(21): 9677-9681.
- Yan, C., Zhao, A. Z., Sonnenburg, W. K. and Beavo, J. A. (2001). "Stage and cell-specific expression of calmodulin-dependent phosphodiesterases in mouse testis." Biol.Reprod. **64**(6): 1746-1754.
- Yan, L., Vatner, D. E., O'Connor, J. P., Ivessa, A., Ge, H., Chen, W., Hirotsu, S., Ishikawa, Y., Sadoshima, J. and Vatner, S. F. (2007). "Type 5 adenylyl cyclase disruption increases longevity and protects against stress." Cell **130**(2): 247-258.
- Ydrenius, L., Majeed, M., Rasmusson, B. J., Stendahl, O. and Sarndahl, E. (2000). "Activation of cAMP-dependent protein kinase is necessary for actin rearrangements in human neutrophils during phagocytosis." Journal of leukocyte biology **67**(4): 520-528.
- Yuasa, K., Kotera, J., Fujishige, K., Michibata, H., Sasaki, T. and Omori, K. (2000). "Isolation and characterization of two novel phosphodiesterase PDE11A variants showing unique structure and tissue-specific expression." J.Biol.Chem. **275**(40): 31469-31479.



Zalavary, S. and Bengtsson, T. (1998). "Adenosine inhibits actin dynamics in human neutrophils: evidence for the involvement of cAMP." European journal of cell biology **75**(2): 128-139.

Zamvil, S. S. and Steinman, L. (1990). "The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis." Annu.Rev.Immunol. **8**: 579-621.

Zhao, A. Z., Huan, J. N., Gupta, S., Pal, R. and Sahu, A. (2002). "A phosphatidylinositol 3-kinase phosphodiesterase 3B-cyclic AMP pathway in hypothalamic action of leptin on feeding." Nature neuroscience **5**(8): 727-728.

Zhou, L., Ivanov, I. I., Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., Levy, D. E., Leonard, W. J. and Littman, D. R. (2007). "IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways." Nat.Immunol. **8**(9): 967-974.

Zimmermann, G. and Taussig, R. (1996). "Protein kinase C alters the responsiveness of adenylyl cyclases to G protein alpha and betagamma subunits." The Journal of biological chemistry **271**(43): 27161-27166.

Zufall, F., Firestein, S. and Shepherd, G. M. (1994). "Cyclic nucleotide-gated ion channels and sensory transduction in olfactory receptor neurons." Annual review of biophysics and biomolecular structure **23**: 577-607.

Zufall, F., Shepherd, G. M. and Barnstable, C. J. (1997). "Cyclic nucleotide gated channels as regulators of CNS development and plasticity." Current opinion in neurobiology **7**(3): 404-412.

***Apèndix***

S'adjunten a continuació les  
publicacions resultants durant el  
període de tesi doctoral.

## **cAMP specific PDE4B2 splice variant plays a role in antigen-presenting cells during experimental autoimmune encephalomyelitis**

Cristina Sanabra<sup>#1</sup>, Emily Johansson<sup>#1</sup>, and Guadalupe Mengod<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departament de Neuroquímica i Neurofarmacologia, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (CSIC), IDIBAPS, CIBERNED, 08036 Barcelona, Spain.

<sup>2</sup>Department of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Sciences, Center for Reproductive Sciences, University of California, San Francisco, San Francisco, CA 94143, USA.

#: Contributed equally to the work.

**Key words:** PDE4B, RT-PCR, *in situ* hybridization, multiple sclerosis, EAE

Sotmès a *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*

## ABSTRACT

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is an animal model of Multiple Sclerosis that courses with neuroinflammation, axonal damage and demyelination. The model is characterized by T- and B-cell responses to myelin oligodendrocyte glycoprotein which produce a wide range of pro- and anti-inflammatory cytokines. The modulation of cAMP levels through pharmacological manipulation of phosphodiesterases (PDEs) provokes profound anti-inflammatory responses. In the EAE model, amelioration of the clinical signs and delayed onset is observed after PDE4 inhibition and the PDE4B gene has been related to the inflammatory immune response in mice. Here we analyzed post-immunization changes in the expression of mRNA coding for the PDE4B2 splice variant by semiquantitative real-time PCR and *in situ* hybridization. The results showed an upregulation of PDE4B2 mRNA in the spinal cord of EAE mice which correlates with FoxP3 and TGF- $\beta$  mRNAs expression in a score-dependent manner. We also found that PDE4B enzyme is mainly localized in antigen-presenting cells (APCs) such as dendritic cells, microglia/macrophages. The results point to an important role of the PDE4B enzyme, and PDE4B2 splice variant in particular, during EAE pathogenesis by modulating cAMP levels in APCs and controlling the cytokine environment for T-cell differentiation.

## INTRODUCTION

Multiple sclerosis (MS) is one of the most common neurological disorders in young adults. It is believed to be a chronic inflammatory disease of the central nervous system (CNS) in which a T helper-cell mediated autoimmune process is associated with myelin destruction (Frohman et al., 2006; Lassmann et al., 2001; Lassmann et al., 2007).

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is an animal model of MS that is induced by active immunization against myelin antigens in genetically susceptible mice strains and reproduces the immunopathology seen in many MS cases (Swanborg, 1995). Several days after immunization, immune cells start to infiltrate the CNS and microglial cells are activated, predominantly affecting the spinal cord but also other brain structures like the cerebellum and the optic tract (Brown and Sawchenko, 2007). This is followed by axonal damage and demyelination (Soulika et al., 2009).

Pharmacological manipulation of cAMP levels using specific PDE4 inhibitors provoke profound anti-inflammatory responses (Nielson et al., 1990; Torphy, 1998), for example, suppression or stimulation of cytokine production, inhibition of T-cell proliferation (Banner and Trevethick, 2004) and production of tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) by monocytes (Jin and Conti, 2002; Sommer et al., 1995). In the EAE model, amelioration of the clinical signs and delayed onset is observed after PDE4 inhibition with Rolipram (Folcik et al., 1999; Moore et al., 2006; Sommer et al., 1995). Furthermore, the PDE4B gene has been related to the inflammatory response in mouse monocytes and macrophages (Jin et al., 2005) and previous publications by our group have shown that the PDE4B mRNA splice variant PDE4B2 is upregulated in the brains of rats with EAE (Reyes-Irisarri et al., 2007b).

Therefore, we examined the role of the observed transcriptional induction of the PDE4B2 mRNA the immunological response in the CNS of an EAE mouse model. The model is characterized by T-

and B-cell responses to myelin oligodendrocyte glycoprotein (Iglesias et al., 2001). Depending on the composition of the inflammatory environment, the differentiation of T-helper (Th)-cells is directed towards effector or regulatory T-cells. Several groups have addressed the involvement of Th17-positive cells as autoimmune effectors in EAE and of Foxp3<sup>+</sup> cells as regulatory T-cells (for review see (Korn et al., 2007; Langrish et al., 2005; Segal, 2010). Among others, TGF- $\beta$  and IL-6 are known to affect the course of differentiating T-cells (Fallarino et al., 2010; Tzartos et al., 2008).

Here we analyzed post-immunization changes in the expression of mRNA coding for the PDE4B2 splice variant by semiquantitative real-time PCR and *in situ* hybridization.

Furthermore, the correlation between infiltrating cell populations, cytokine production and PDE4B2 mRNA expression in the brain of animals with EAE of varying score and at different time points after immunization was analyzed. The results point to an important role of the PDE4B2 mRNA splice variant during EAE pathogenesis. The upregulation of PDE4B2 mRNA in the EAE mice correlated with the Foxp3<sup>+</sup> transcription factor and TGF- $\beta$  mRNAs in a score-dependent manner. The induced PDE4B protein was mainly observed in antigen-presenting cells such as dendritic cells (DCs), microglia/macrophages and also astrocytes.

## MATERIALS AND METHODS

### EAE induction and treatment

Six-week-old female C57BL6 mice (15-20 g) were purchased from Charles River Laboratories (Lyon, France). All

experimental procedures followed the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC), and were approved by the ethic committee of the University of Barcelona and of the Generalitat de Catalunya. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering. The mice were maintained on a 12-h light/dark cycle at a constant environmental temperature with free access to food and water for 1 week prior to experimentation.

EAE was induced by subcutaneous immunization with 100 $\mu$ g MOG<sub>35-55</sub> peptide (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) in 100 $\mu$ l complete Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich) enriched with *Mycobacterium tuberculosis* (Difco, Detroit, MI, USA) on day 0, followed by 200ng of pertussis toxin injected intraperitoneally on days 0 and 2. "CFA control mice" received CFA and pertussis toxin, but no MOG<sub>35-55</sub> peptide, and normal control mice received saline only.

Animals were weighed and examined daily and the severity of their clinical disease was graded using a five-point scale: Grade 0 = no disability; 1 = a flaccid tail; 2 = a mild but definite weakness of one or both hind legs; 3 = moderate paraparesis of one hind leg; 4 = no hind leg movement; 5 = a moribund state with little or no spontaneous movement and impaired respiration (McFarlin et al., 1974).

### Tissue preparation

The brain and spinal cord were removed, rapidly frozen on dry ice and stored at -20 °C on post-immunization days 10, 15, 21 and 30. For *in situ* hybridization, immunohistochemistry and histology, 14- $\mu$ m thick coronal tissue sections of whole brain were cut on a microtome-cryostat (Microm

HM500 OM, Walldorf, Germany), thaw-mounted on 3-aminopropyltriethoxysilane-coated slides (Sigma-Aldrich), and stored at -20 °C until further processing.

### Hybridization probes

We used an oligonucleotide probe complementary to the mRNA coding for the PDE4B2 splice variant (L27058, 545-589 bp). The mRNA region was chosen because it shares no similarities with other PDE4B splice variants (Reyes-Irisarri et al., 2008). The hybridization conditions used to detect all mRNAs have been described elsewhere (Reyes-Irisarri et al., 2005). All oligonucleotides were synthesized and were then purified by high-performance liquid chromatography (Isogen Bioscience BV, Maarsden, The Netherlands).

The specificity of the autoradiographic signal obtained by *in situ* hybridization histochemistry experiments was confirmed by a series of routine controls as described previously (Pompeiano et al., 1992).

Oligonucleotides were labeled at their 3'-end using [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dATP (3000 Ci/mmol, New England Nuclear, Boston, MA, USA) with recombinant terminal deoxynucleotidyltransferase (TdT) (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany). Labeled probes were purified using ProbeQuant G-50 Microcolumns (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

### Luxol Fast Blue staining

Sections were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min and rinsed twice in PBS for 5 min each. After 4-8h in alcohol/chloroform the sections were rehydrated in 95% alcohol. Staining with Solvent Blue 38 (Sigma-Aldrich) Staining Solution (0.1%) at 56°C o.n. was followed by differentiation in a lithium carbonate

solution (0.05%) and alcohol. After a water rinse, the sections were counterstained for 30-40 sec in Cresyl-Violet (Sigma-Aldrich) then rinsed in water, dried, soaked with xylene, and mounted with Entellan.

### *In situ* hybridization histochemistry

The protocols for *in situ* hybridization histochemistry were based on previously described procedures (Reyes-Irisarri et al., 2007a; Tomiyama et al., 1997). Hybridized sections were either exposed to Biomax-MR (Kodak, Rochester, NY, USA) or dipped into Ilford K5 nuclear emulsion (Ilford, Mobberly, Cheshire, UK).

### Immunohistochemistry

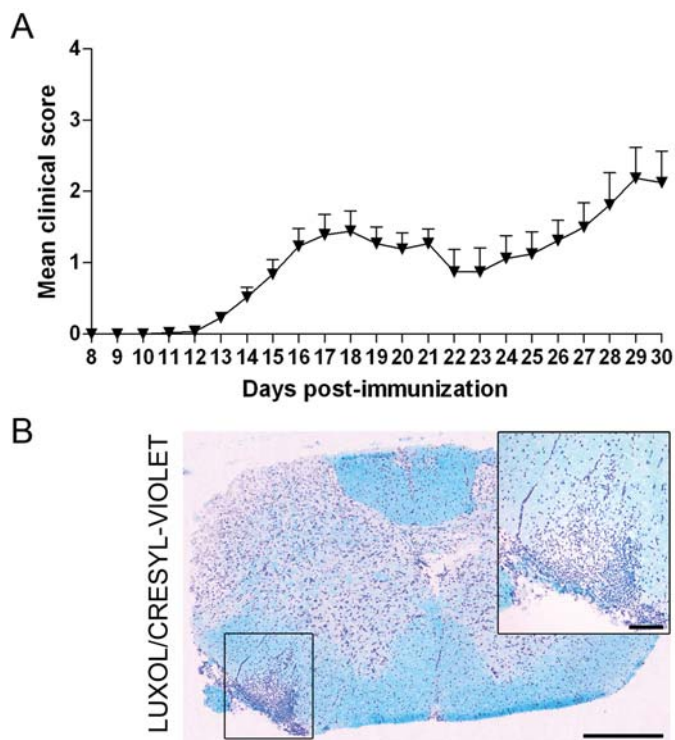
The following antibodies (see also **Supplemental Table 1**) were used: rabbit anti-human CD3 (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark), rabbit anti-PDE4B (FabGennix, Inc., Frisco, TX, USA), rabbit anti-Iba1 (Wako, Neuss, Germany) to detect microglia/macrophages, and rabbit anti-GFAP (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) to detect astrocytes; and the monoclonal antibodies rat anti-MBP (Abcam, Cambridge, UK) to detect oligodendrocytes, rat anti-NIMP-R14 (Millipore, CA, USA) for neutrophil staining, and rat anti-CD11b (AbD Serotec, Oxford, UK) for microglia. Immunohistochemistry was performed as follows: sections were fixed for 20 min at 4°C in 4% paraformaldehyde, and rinsed three times in 1x TBS (Tris Buffer Saline; 50 mM Tris.HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4) for 5 minutes. Pre-incubation and incubation with antibodies were performed in 1x TBS with 0.05% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) solution containing 10% normal goat serum (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) in 0.3M glycine (Calbiochem, Dramstadt,



Germany). Primary antibody was incubated at 37°C o.n. and secondary antibodies or Alexa Fluor® (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) at 37°C for 30 minutes. Control slides were incubated without primary antibody. After rinsing in 1x TBS and in distilled water the sections were mounted with VECTASHIELD® + DAPI (Vector Laboratories) to stain the nuclei.

### Analysis of the results

Hybridized tissue sections were examined in bright- and dark-field under a Zeiss



Axioplan microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with bright- and dark-field condensers for transmitted light and with epi-illumination. A Darklite illuminator (Micro Video Instruments, Avon, MA, USA) was used to improve the visualization of autoradiographic silver grains and capture bright- and dark-field images. Double immunofluorescence-labeled tissue sections were analyzed using an Olympus BX51 Stereo Microscope (Olympus, Tokyo, Japan).

**Figure 1.** Clinical and histological evaluation of EAE in C57BL/6 mice. **(A)** Mean  $\pm$  SD clinical score as a function of days after immunization with the MOG peptide. Clinical Score; 0 = no disability, 1 = flaccid tail, 2 = a mild but definite weakness of one or both hind legs, 3 = moderate paraparesis of one hind leg, 4 = no hind leg movement, 5 = a moribund state with little or no spontaneous movement and impaired respiration. **(B)** Histopathological analysis of spinal cord section stained with Luxol/Cresyl-Violet to evaluate myelin depletion and inflammatory infiltrates respectively. The strong cellular invasion observed here, 30 days post-immunization, were found associated with demyelination. Scale bars = 0.5 mm and 100  $\mu$ m.

### Preparation of the figures

Photographs of the film autoradiograms of hybridized sections were obtained using a Wild 420 macroscope (Leica, Solms, Germany) equipped with a digital camera (DXM1200 F, Nikon, Tokyo, Japan) and ACT-1 Nikon software. Microphotographs of the hybridized tissue slides were taken with a Zeiss Axioplan microscope, equipped with a Darklite illuminator and a digital camera (DXM1200 F, Nikon) with ACT-1 Nikon software. Double immunofluorescent-labeled sections were photographed in an Olympus BX51 Stereo Microscope equipped with a digital camera (DP71, Olympus, Tokyo, Japan). The figures were assembled using Adobe Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA, USA); only contrast and brightness were adjusted to optimize the images.

### RNA isolation and qRT/PCR

Cervical spinal cords were homogenized using TRIzol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and a tissue homogenizer (Polytron PT1200, Kinematica AG, Lucerne, Swiss). Total RNA was isolated using a PureLink RNA Mini Kit according to the manufacturer's instructions (Invitrogen) and stored at -80°C. Before cDNA synthesis, RNA samples were treated with DNase I (Invitrogen) to remove the genomic DNA. Samples of total RNA (1  $\mu$ g each) were reverse-transcribed into cDNA

using the iScript kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Gene transcripts were quantified by quantitative real-time RT-PCR using the iQ SYBR Green Supermix kit (Bio-Rad) in triplicate in 25  $\mu$ l reaction volumes. Primers were synthesized by Biomers.net GmbH (Ulm, Germany); their sequences are listed in **Supplemental Table 2**. Samples were run on an iCycler iQ (Bio-Rad). For relative quantification, the  $n$ -fold differential expression was determined by the comparative cycle threshold (CT) method ( $2^{-\Delta\Delta^{CT}}$ ), normalized to the HPRT endogenous reference gene. Negative control experiments were performed without the addition of template cDNA. End reaction products were visualized using SYBR Safe (Invitrogen) in 3.4% agarose gels to verify the correct product sizes.

## RESULTS

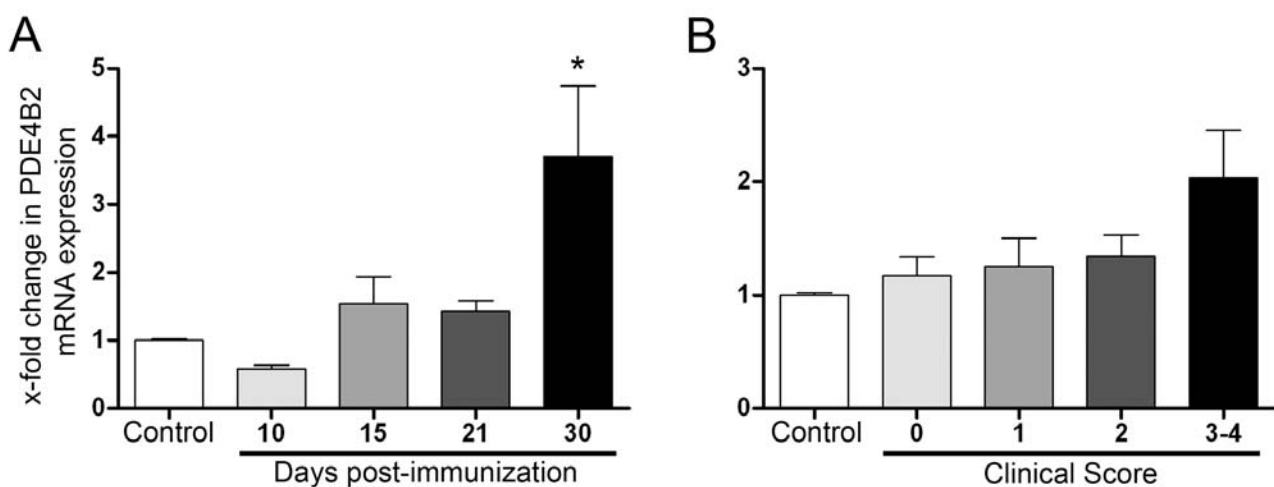
### *The chronic model of EAE in C57BL/6 mice*

EAE was induced in C57BL/6 mice by immunization with MOG<sub>35-55</sub> in Complete Freund's adjuvant on day 0. Clinical signs and score were monitored up to day 30. Mice began to show neurological deficits on

EAE at day 10, just after the onset of disease on day 15, around the peak on day 21, and on day 30. The chronic neurological deficits are summarized in Figure 1A. CFA control mice showed no clinical score (data not shown). Demyelination and cellular infiltration in brain parenchyma were observed by staining the spinal cord and brain sections with Luxol/Cresyl-Violet (Fig. 1B). Observations with SMI-32 and FluoroJadeB also confirmed the presence of axonal damage and neurodegeneration in our EAE model (data not shown).

### *PDE4 mRNA expression in the central nervous system of mice with EAE*

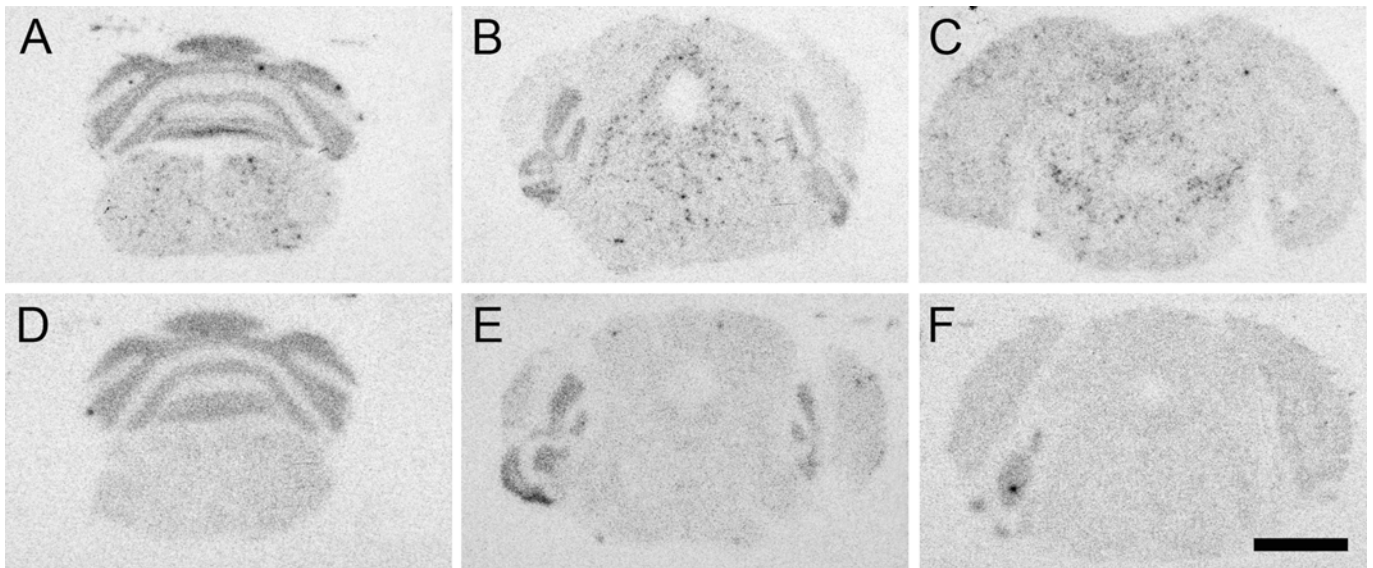
We analyzed the mRNA levels of the PDE4B2 splice variant in mouse brain and spinal cord at different times post-immunization. The results obtained in spinal cord sections of EAE and control mice using semiquantitative real-time RT-PCR revealed upregulation of PDE4B2 mRNA expression that increased with the time after MOG<sub>35-55</sub> immunization, being statistically significant in animals at 30 days post-immunization (Fig. 2A). We also observed a trend for



days 12 and 13, reaching a peak between days 17 and 21. We focused on the response in animals before the onset of

PDE4B2 mRNA upregulation at higher disease scores (Fig. 2B). Changes in various inflammatory markers (TNF- $\alpha$ , IL-6,





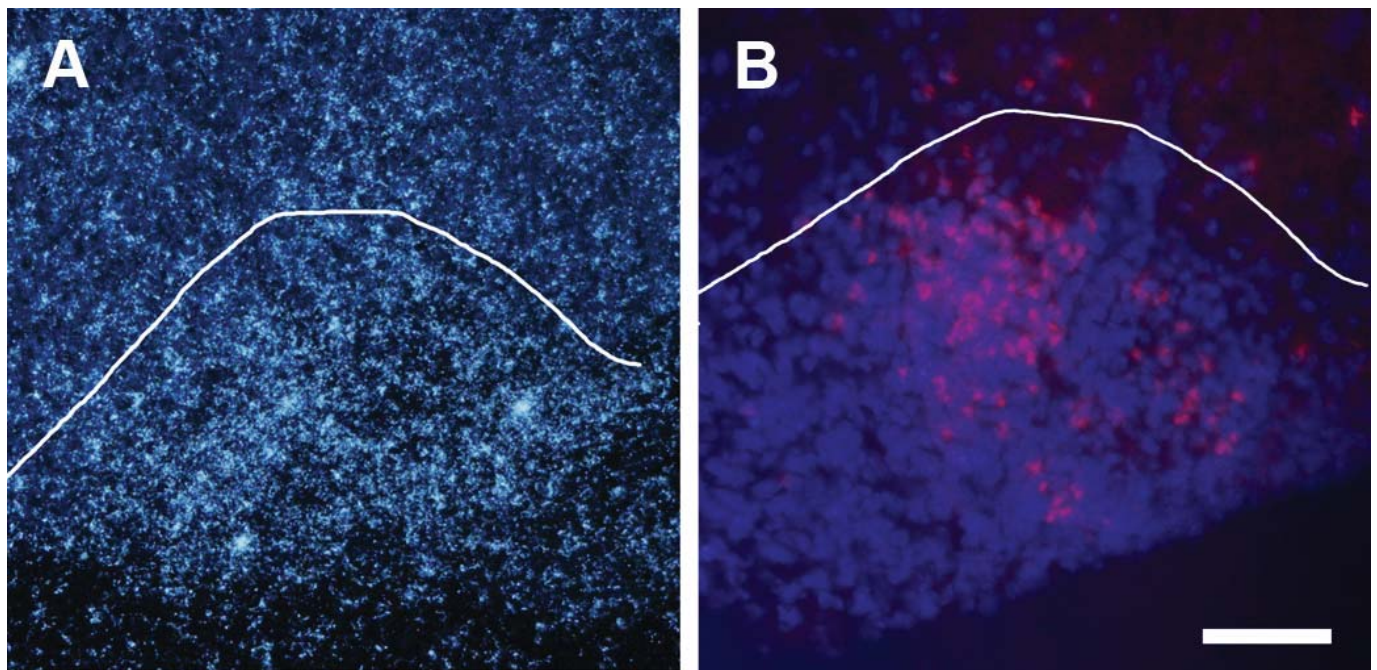
FoxP3, Il-17, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  and TGF- $\beta$ ) were also investigated via semiquantitative real-time RT-PCR to validate the immune response in our model (data not shown).

The expression pattern of PDE4B2 mRNA using radioactive *in situ* hybridization

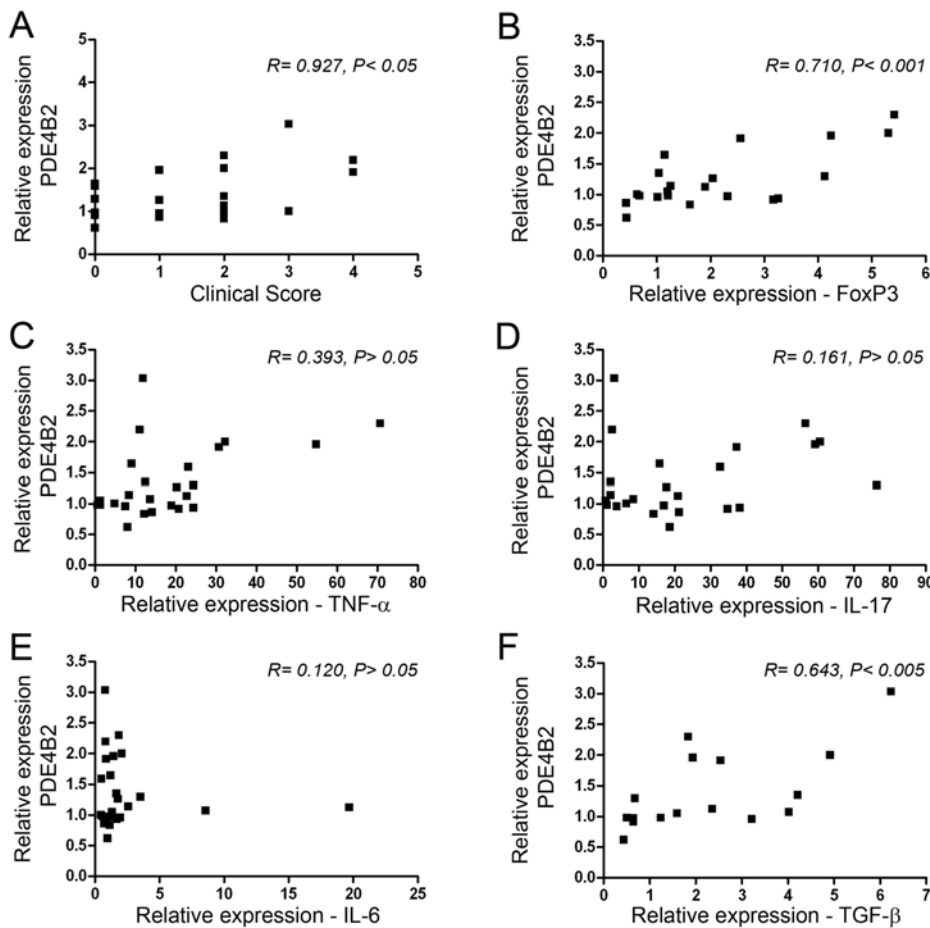
**Figure 2.** Expression of PDE4B2 mRNA in spinal cord of EAE mice represented by (A) clinical score at 21 days post-immunization and (B) 10, 15, 21 and 30 days post-immunization. PDE4B2 mRNA expression was determined by semiquantitative real-time RT-PCR (corrected for the housekeeping gene HPRT). Error bars indicate SEM value. \*,  $P < 0.05$ .

histochemistry in the brain stem from EAE mice with established disease, i.e. 30 days post-immunization, is shown in Figure 3A-C, and for CFA-control mice in Figure 3D-F.

The



**Figure 3.** PDE4B2 splice variant mRNA expression in mice with EAE 30 days following immunization. Macroscopic photographs of film autoradiographic images of spinal cord and coronal sections of CNS parenchyma showed upregulation of the mRNA hybridization in immunized mice (A-D) compared to control (E-H). Note how the strong mRNA upregulation throughout the whole CNS appears to have a scattered pattern. Scale bar = 2mm.



**Figure 5.** Correlation between clinical score and PDE4B2 expression and between some inflammatory markers (TNF- $\alpha$ , FoxP3 and IL-17) and PDE4B2 expression in spinal cords of EAE mice. mRNA expression of PDE4B2 and inflammatory markers was determined by semiquantitative real-time RT-PCR. HPRT was used as an internal control for normalization of each gene analyzed. The correlation between the mRNA level of PDE4B2 and clinical score or inflammatory markers mRNA expression of individual mice was assessed by Pearson correlation analysis, and was as follows: **(A)** clinical score ( $R=0.927$ ;  $P<0.05$ ); **(B)** TNF- $\alpha$  ( $R=0.393$ ;  $P>0.05$ ); **(C)** IL-17 ( $R=0.161$ ;  $P>0.05$ ); **(D)** FoxP3 ( $R=0.711$ ;  $P<0.001$ ); **(E)** IL-6 ( $R=0.12$ ;  $P>0.05$ ); **(F)** TGF- $\beta$  ( $R=0.643$ ;  $P<0.005$ ). Each dot represents one mouse.  $R$ : correlation coefficient.

upregulation of PDE4B2 mRNA expression is visible as dark patches of autoradiographic grains at several levels of the brain stem of the EAE mouse shown in this figure, whereas in CFA-treated control mice no alterations in the hybridization signal were observed.

The mRNA levels for PDE4B2 revealed a significant correlation (Pearson correlation,  $R=0.927$ ;  $P<0.05$ ) with disease severity in animals exhibiting different clinical scores at the peak of the disease (Fig. 5A).

**Figure 4.** PDE4B expression in the spinal cord of a mouse with EAE 30 days following immunization. **(A)** High-magnification dark-field microphotograph of emulsion-dipped section show PDE4B2

mRNA upregulation pattern visualized by *in situ* hybridization (clusters of silver grains). Note the similarity to pattern of cellular infiltration. **(B)** Clear immunohistochemistry staining of PDE4B<sup>+</sup>-cells (red) were observed in areas with strong invasion of inflammatory cells, represented here with DAPI counterstaining (blue). Scale bar = 50  $\mu$ m.

Comparison of the expression levels of PDE4B2 and inflammatory markers such as TNF $\alpha$ , IL-17, TGF- $\beta$ , IL-6 and FoxP3 (Figs. 5B-F) revealed statistically significant correlations (Pearson correlation) between PDE4B2 and FoxP3 mRNA expression ( $R=0.71$ ;  $P<0.001$ ) (Fig. 5B) and with TGF- $\beta$  ( $R=0.64$ ;  $P<0.005$ ).

*PDE4B protein expression in the central nervous system of mice with EAE*

In order to determine whether PDE4B2 mRNA upregulation in the cellular infiltrates

of the EAE brain corresponded to an increase in the amount of synthesized protein we incubated tissue sections with an antibody against PDE4B (Fig. 4B) and compared them to a consecutive spinal cord section hybridized for PDE4B2 mRNA, and visualized by liquid emulsion autoradiography (Fig. 4A). Areas with strong invasion of inflammatory infiltrates, as also observed with DAPI, coincided with clear immunostaining of PDE4B<sup>+</sup>-cells (Fig. 4B). In general these areas were close to the

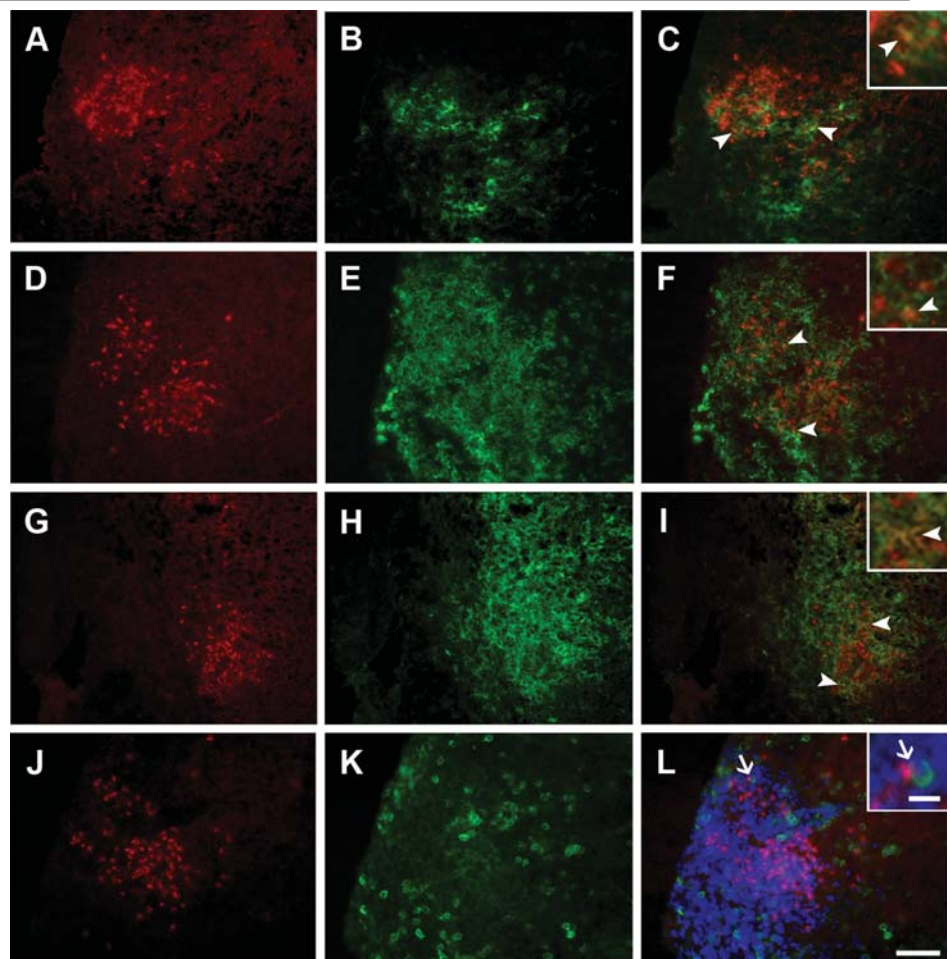


meninges, aqueduct, 4<sup>th</sup> ventricle walls and microvessels.

We further identified the nature of the cellular infiltrates expressing PDE4B protein. For this, tissue sections were double-stained with the PDE4B antibody and with antibodies against microglia/macrophages (CD11b<sup>+</sup> and Iba1<sup>+</sup>-cells), oligodendrocytes (MBP<sup>+</sup>-cells), astrocytes (GFAP<sup>+</sup>-cells), T-cells (CD3<sup>+</sup>-cells), neutrophils, and dendritic cells (CD11c<sup>+</sup>-cells) (Fig. 6). We observed that microglia/macrophages and dendritic cells partly colocalized with PDE4B<sup>+</sup>-cells (Fig. 6A-I). Surprisingly, no colocalization was observed between T-cells and PDE4B<sup>+</sup>-cells (Fig. 6J-L), but polarization of PDE4B at the contact point of the cells could be detected (Fig. 6L). Oligodendrocytes were clearly absent in the areas showing cellular infiltration, indicating demyelination (Supplemental Fig. 1).

## DISCUSSION

The involvement of cAMP signaling pathways during neuroinflammation is well



**Figure 6.** Immunohistochemistry for antigen-presenting cells in consecutive spinal cord sections from a 30 days post-immunization mouse. Staining with the PDE4B antibody in mice with EAE was observed in association with areas that demonstrated strong invasion of inflammatory infiltrates. Dual immunostaining localization of PDE4B<sup>+</sup>-cells (red) and (A-C) CD11c<sup>+</sup>-dendritic cells (green), (D-F) CD11b<sup>+</sup>-microglia/macrophages (green), (G-I) Iba1<sup>+</sup>-microglia/macrophages (green), and (J-L) CD3<sup>+</sup>-T cells (green) and DAPI<sup>+</sup>-nuclei (blue). Magnification box in L shows the synapse-like structure of CD3<sup>+</sup>-T cells and PDE4B<sup>+</sup>-cells. Note the polarization of PDE4B (red) at the contact point of the cells (arrow). Colocalization of both proteins (arrowheads). Scale bars = 50  $\mu$ m and 10  $\mu$ m.

recognized and particular interest has focused on the possibility of manipulating cAMP levels with PDE inhibitors to control inflammation. Specific inhibition of the PDE4-family has anti-inflammatory effects such as cytokine suppression or stimulation (reviewed in (Banner and Trevethick, 2004; Torphy, 1998)) and inhibition of TNF- $\alpha$  secretion (Jin and Conti, 2002; Sommer et al., 1995). Several PDE4 inhibitors are currently under development for the treatment of inflammatory airway diseases, such as asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD), along with inflammatory

bowel disease, based on the knowledge of the role of PDE4 in suppressing the function of a range of inflammatory and resident cells related to these diseases (Hatzelmann et al., 2010; Spina, 2008). Additionally, as mentioned in the introduction, amelioration of the clinical signs and a delayed onset is observed in EAE after PDE4 inhibition with Rolipram (Folcik et al., 1999; Moore et al., 2006; Sommer et al., 1995). However, inhibition of the PDE4-family implies the general inhibition of the four PDE4 subfamilies, PDE4A, PDE4B, PDE4C and PDE4D, all of which show a tissue- and cell-specific distribution (Cherry and Davis, 1999; Miró X et al., 2002; Pérez-Torres et al., 2000; Reyes-Irisarri et al., 2008) as well as intracellular compartmentalization (Arp et al., 2003). Furthermore, the emetic side effects observed in clinical trials with PDE4 inhibitors (Hebenstreit et al., 1989) are related to the expression of PDE4 mRNAs present in the area postrema (Takahashi et al., 1999; Pérez-Torres et al., 2000; Mori et al., 2010). For this reason, more detailed knowledge about the anatomical and cellular localization and involvement of specific PDE4 mRNA splice variants in the EAE model would allow progress in the therapeutic use of these inhibitors in MS patients.

This study revealed that the only PDE4 subfamily showing alterations in mice with EAE was the PDE4B family. Furthermore, upregulation of PDE4B2 mRNA splice variant expression was observed in the spinal cord and brain stem early during disease, confirming previous results in the EAE rat brain (Reyes-Irisarri et al., 2007b). Upregulation of PDE4B2 mRNA expression was observed around the onset of the disease, and was significantly elevated in animals with ongoing EAE. This

transcriptional upregulation was found in several brain areas, indicative of overexpression beginning in the spinal cord during disease onset and later spreading throughout the posterior brain areas. This pattern is comparable to that observed for infiltrating cells in the EAE brain during disease (Brown and Sawchenko, 2007), suggesting that many of these cells express PDE4B2 at high levels. The correlation between PDE4B2 mRNA expression and the clinical score reported here further supports this assumption, since an advanced clinical score is associated with an elevated number of cellular infiltrates (Brown and Sawchenko, 2007).

In the EAE model, peripheral antigen-presenting cells (APCs) like DCs and macrophages associated with the meninges and CNS blood vessels are postulated to allow encephalitogenic T-cells to recognize their antigens, leading to infiltration and initiating an inflammatory cascade that culminates in tissue damage (Greter et al., 2005; Sospedra and Martin, 2005). DCs and macrophages are also known to infiltrate the CNS where lymphocytes are reactivated by the main APC population in the parenchyma, namely microglia, as reviewed in (Almolda et al., 2011). Activation/suppression of the APCs and the cytokine environment are, among others things, controlled by cAMP levels (Fassbender et al., 2010; Garay et al., 2010; Kambayashi et al., 2001). Taken together, the upregulation of PDE4B2 mRNA observed as patches in the brain parenchyma around microvessels and the role of cAMP in the antigen presentation process suggest that the PDE4B2 enzyme could regulate cAMP levels in the APCs in blood vessel-enriched areas of the CNS. This is further supported by the

colocalization shown between PDE4B and the cellular markers of different APC populations (DCs, microglia and macrophages).

The T-cell populations that have a crucial role in the EAE model are Th1- and Th17-positive (Segal, 2010; Tzartos et al., 2008; Zamvil and Steinman, 1990; Komiyama et al., 2006). These immune cells infiltrate and attack oligodendrocytes and activate resident microglia and astrocytes, leading to demyelination and axonal damage (Soulika et al., 2009; Lassmann et al., 2001). Another T-cell population, FoxP3<sup>+</sup>Treg, regulates the immunological response e.g. by the secretion of anti-inflammatory cytokines (Korn et al., 2007). The correlation that we observed between the relative expression of the transcription factor FoxP3 and PDE4B2 mRNA suggests that in mice with EAE, greater differentiation towards the FoxP3<sup>+</sup>Treg phenotype takes place, and that PDE4B2 might play a role in this process, perhaps by stabilizing the functional phenotype of these cells (Gavin et al., 2007). The conversion of T-cells into Foxp3<sup>+</sup> T-regs or Th17<sup>+</sup>-cells is dependent on the inflammatory environment. Among others, the cytokines TGF- $\beta$  and IL-6 are important in the balance between these two cell populations (Deshpande et al., 2007; Fallarino et al., 2010; Korn et al., 2007). The correlation observed between TGF- $\beta$  and PDE4B2 mRNA and the lack of correlation with IL-6 further supports the hypothesis that this enzyme has a possible role in T-regs differentiation. However, the augmented PDE4B protein expression was not observed to colocalize with infiltrating T-cells. This indicates that the enzyme does not affect T-cell differentiation through a T-cell related intracellular mechanism. Nevertheless, the polarization observed for

PDE4B protein at the contact point of CD3<sup>+</sup>-cells and PDE4B<sup>+</sup>-cells might imply a role of this enzyme during the antigen-presenting process in brain parenchyma.

On the other hand, here we show localization of PDE4B in microglia/macrophages that coincides with the expression of TGF- $\beta$  mRNA following brain injury (Lindholm et al., 1992). IL-6 production and subsequent PKA/cAMP pathway activation has also been observed in the same cell populations (Hashioka et al., 2007; Delfino and Walker, 1999; Fallarino et al., 2010), connecting both cytokines to PDEs in a spatial and mechanistic manner.

Given the correlation observed between the relative expression of Foxp3 or TGF- $\beta$  and PDE4B2 mRNA and the presence of PDE4B in APCs like DCs, microglia and macrophages, we postulate that PDE4B, and PDE4B2 in particular, plays an important role in the conversion of T-cells into Th17<sup>+</sup> or Foxp3<sup>+</sup> T-reg by regulating cAMP levels in APCs.

Based on these results, the importance of cAMP regulation by the PDE4B enzyme in APC activation/suppression and T-cell differentiation may have relevance regarding the pathogenesis and possible therapeutic targets of this disease.

#### Acknowledgements

We thank Rocio Martín for technical assistance and Robin Craft for English corrections.

#### REFERENCES

- Almolada B, Gonzalez B, Castellano B. 2011. Antigen presentation in EAE: role of microglia, macrophages and dendritic cells. *Front Biosci* 16:1157-1171.
- Arp J, Kirchhof MG, Baroja ML, Nazarian SH, Chau TA, Strathdee CA, Ball EH, Madrenas J. 2003.



- Regulation of T-cell activation by phosphodiesterase 4B2 requires its dynamic redistribution during immunological synapse formation. *Mol Cell Biol* 23:8042-8057.
- Banner KH, Trevethick MA. 2004. PDE4 inhibition: a novel approach for the treatment of inflammatory bowel disease. *Trends in Pharmacological Sciences* 25:430-436.
- Brown DA, Sawchenko PE. 2007. Time course and distribution of inflammatory and neurodegenerative events suggest structural bases for the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Comparative Neurology* 502:236-260.
- Cherry JA, Davis RL. 1999. Cyclic AMP phosphodiesterases are localized in regions of the mouse brain associated with reinforcement, movement, and affect. *J Comp Neurol* 407:287-301.
- Delfino F, Walker WH. 1999. Hormonal regulation of the NF-kappaB signaling pathway. *Mol Cell Endocrinol* 157:1-9.
- Deshpande P, King IL, Segal BM. 2007. Cutting edge: CNS CD11c+ cells from mice with encephalomyelitis polarize Th17 cells and support CD25+CD4+ T cell-mediated immunosuppression, suggesting dual roles in the disease process. *J Immunol* 178:6695-6699.
- Fallarino F, Volpi C, Fazio F, Notartomaso S, Vacca C, Busceti C, Biciato S, Battaglia G, Bruno V, Puccetti P, Fioretti MC, Nicoletti F, Grohmann U, Di Marco R. 2010. Metabotropic glutamate receptor-4 modulates adaptive immunity and restrains neuroinflammation. *Nat Med* 16:897-902.
- Fassbender M, Gerlitzki B, Ullrich N, Lupp C, Klein M, Radsak MP, Schmitt E, Bopp T, Schild H. 2010. Cyclic adenosine monophosphate and IL-10 coordinately contribute to nTreg cell-mediated suppression of dendritic cell activation. *Cell Immunol* 265:91-96.
- Folcik VA, Smith T, O'Bryant S, Kawczak JA, Zhu B, Sakurai H, Kajiwara A, Staddon JM, Glabinski A, Chernosky AL, Tani M, Johnson JM, Tuohy VK, Rubin LL, Ransohoff RM. 1999. Treatment with BBB022A or rolipram stabilizes the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis: an additional mechanism for the therapeutic effect of type IV phosphodiesterase inhibitors. *J Neuroimmunol* 97:119-128.
- Frohman EM, Racke MK, Raine CS. 2006. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* 354:942-955.
- Garay J, D'Angelo JA, Park Y, Summa CM, Aiken ML, Morales E, Badizadegan K, Fiebiger E, Dickinson BL. 2010. Crosstalk between PKA and Epac regulates the phenotypic maturation and function of human dendritic cells. *J Immunol* 185:3227-3238.
- Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, Beavo JA, Rudensky AY. 2007. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* 445:771-775.
- Greter M, Heppner FL, Lemos MP, Odermatt BM, Goebels N, Laufer T, Noelle RJ, Becher B. 2005. Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nat Med* 11:328-334.
- Hashioka S, Klegeris A, Monji A, Kato T, Sawada M, McGeer PL, Kanba S. 2007. Antidepressants inhibit interferon-gamma-induced microglial production of IL-6 and nitric oxide. *Exp Neurol* 206:33-42.
- Hatzelmann A, Morcillo EJ, Lungarella G, Adnot S, Sanjar S, Beume R, Schudt C, Tenor H. 2010. The preclinical pharmacology of roflumilast - A selective, oral phosphodiesterase 4 inhibitor in development for chronic obstructive pulmonary disease. *Pulm Pharmacol Ther*.
- Hebenstreit GF, Fellerer K, Fichte K, Fischer G, Geyer N, Meya U, Hernandez M, Schony W, Schratzer M, Soukop W, . 1989. Rolipram in major depressive disorder: results of a double-blind comparative study with imipramine. *Pharmacopsychiatry* 22:156-160.
- Iglesias A, Bauer J, Litzenburger T, Schubart A, Linington C. 2001. T- and B-cell responses to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Glia* 36:220-234.
- Jin SL, Lan L, Zoudilova M, Conti M. 2005. Specific role of phosphodiesterase 4B in lipopolysaccharide-induced signaling in mouse macrophages. *J Immunol* 175:1523-1531.
- Jin SLC, Conti M. 2002. Induction of the cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE4B is essential for LPS-activated TNF-alpha responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:7628-7633.
- Kambayashi T, Wallin RP, Ljunggren HG. 2001. cAMP-elevating agents suppress dendritic cell function. *J Leukoc Biol* 70:903-910.
- Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, Sudo K, Iwakura Y. 2006. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 177:566-573.
- Korn T, Reddy J, Gao W, Bettelli E, Awasthi A, Petersen TR, Backstrom BT, Sobel RA, Wucherpfennig KW, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. 2007. Myelin-specific regulatory T cells

- accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat Med* 13:423-431.
- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201:233-240.
- Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti C. 2001. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med* 7:115-121.
- Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti CF. 2007. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol* 17:210-218.
- Lindholm D, Castren E, Kiefer R, Zafra F, Thoenen H. 1992. Transforming growth factor-beta 1 in the rat brain: increase after injury and inhibition of astrocyte proliferation. *J Cell Biol* 117:395-400.
- McFarlin DE, Blank SE, Kibler RF. 1974. Recurrent experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. *J Immunol* 113:712-715.
- Miró X, Perez-Torres S, Puigdomenech P, Palacios JM, Mengod G. 2002. Differential distribution of PDE4D splice variant mRNAs in rat brain suggests association with specific pathways and presynaptical localization. *Synapse* 45:259-269.
- Moore CS, Earl N, Frenette R, Styhler A, Mancini JA, Nicholson DW, Hebb AL, Owens T, Robertson GS. 2006. Peripheral phosphodiesterase 4 inhibition produced by 4-[2-(3,4-Bis-difluoromethoxyphenyl)-2-[4-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-hydroxypropyl)-phenyl]-ethyl]-3-methylpyridine-1-oxide (L-826,141) prevents experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Pharmacol Exp Ther* 319:63-72.
- Mori F, Perez-Torres S, De Caro R, Porzionato A, Macchi V, Beleta J, Gavalda A, Palacios JM, Mengod G. 2010. The human area postrema and other nuclei related to the emetic reflex express cAMP phosphodiesterases 4B and 4D. *J Chem Neuroanat* 40:36-42.
- Nielson CP, Vestal RE, Sturm RJ, Heaslip R. 1990. Effects of Selective Phosphodiesterase Inhibitors on the Polymorphonuclear Leukocyte Respiratory Burst. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 86:801-808.
- Pérez-Torres S, Miró X, Palacios JM, Cortés R, Puigdoménech P, Mengod G. 2000. Phosphodiesterase type 4 isozymes expression in human brain examined by in situ hybridization histochemistry and [3H]rolipram binding autoradiography. Comparison with monkey and rat brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 20:349-374.
- Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G. 1992. Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT1A receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. *J Neurosci* 12:440-453.
- Reyes-Irisarri E, Perez-Torres S, Mengod G. 2005. Neuronal expression of cAMP-specific phosphodiesterase 7B mRNA in the rat brain. *Neuroscience* 132:1173-1185.
- Reyes-Irisarri E, Perez-Torres S, Miro X, Martinez E, Puigdomenech P, Palacios JM, Mengod G. 2008. Differential distribution of PDE4B splice variant mRNAs in rat brain and the effects of systemic administration of LPS in their expression. *Synapse* 62:74-79.
- Reyes-Irisarri E, Sanchez AJ, Garcia-Merino JA, Mengod G. 2007a. Selective induction of cAMP phosphodiesterase PDE4132 expression in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 66:923-931.
- Reyes-Irisarri E, Sanchez AJ, Garcia-Merino JA, Mengod G. 2007b. Selective induction of cAMP phosphodiesterase PDE4B2 expression in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 66:923-931.
- Segal BM. 2010. Th17 cells in autoimmune demyelinating disease. *Semin Immunopathol* 32:71-77.
- Sommer N, Loschmann PA, Northoff GH, Weller M, Steinbrecher A, Steinbach JP, Lichtenfels R, Meyermann R, Riethmuller A, Fontana A, Dichgans J, Martin R. 1995. The Antidepressant Rolipram Suppresses Cytokine Production and Prevents Autoimmune Encephalomyelitis. *Nature Medicine* 1:244-248.
- Sospedra M, Martin R. 2005. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 23:683-747.
- Soulika AM, Lee E, McCauley E, Miers L, Bannerman P, Pleasure D. 2009. Initiation and progression of axonopathy in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci* 29:14965-14979.
- Spina D. 2008. PDE4 inhibitors: current status. *British Journal of Pharmacology* 155:308-315.
- Swanborg RH. 1995. Experimental autoimmune encephalomyelitis in rodents as a model for human demyelinating disease. *Clin Immunol Immunopathol* 77:4-13.
- Takahashi M, Terwilliger R, Lane C, Mezes PS, Conti M, Duman RS. 1999. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP-

specific phosphodiesterase 4A and 4B isoforms. *J Neurosci* 19:610-618.

Tomiyama M, Palacios JM, Cortés R, Vilaró MT, Mengod G. 1997. Distribution of AMPA receptor subunit mRNAs in the human basal ganglia: an in situ hybridization study. *Mol Brain Res* 46:281-289.

Torphy TJ. 1998. Phosphodiesterase isozymes - Molecular targets for novel antiasthma agents. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 157:351-370.

Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, Fugger L. 2008. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* 172:146-155.

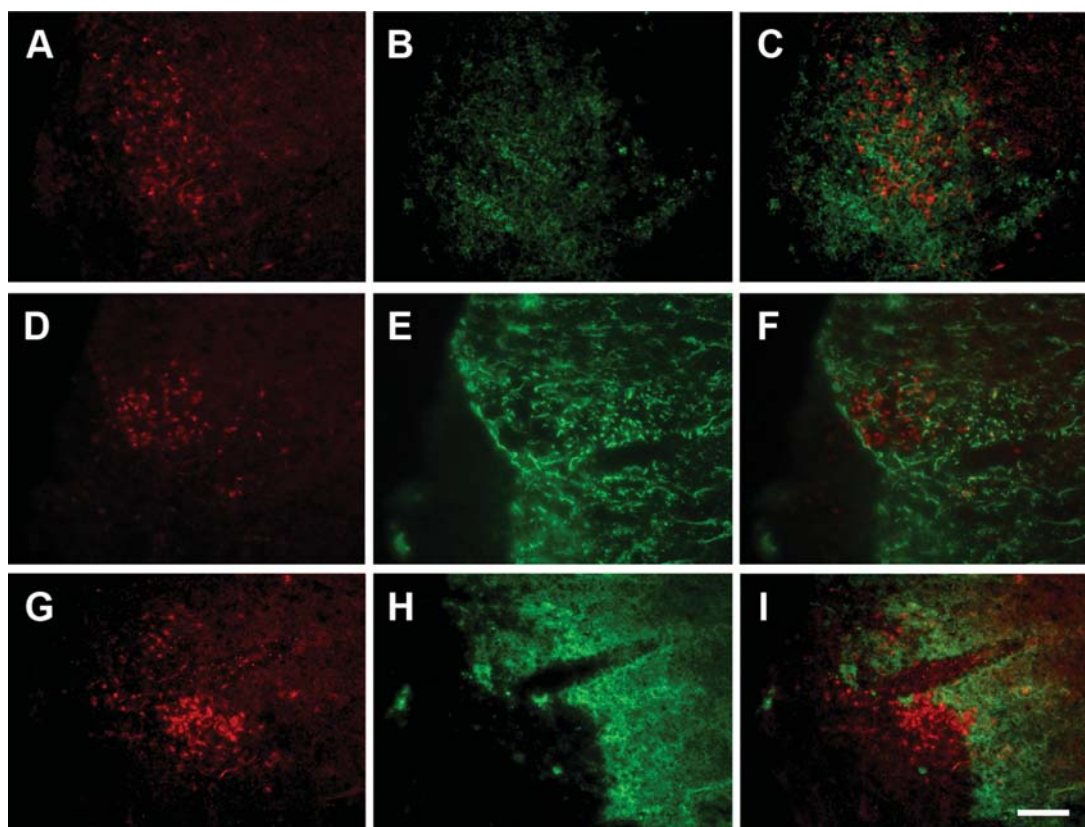
Zamvil SS, Steinman L. 1990. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol* 8:579-621.

**SUPPLEMENTAL MATERIAL**

**Supplemental Table 1.** List of the antibodies used.

<b>Antibody</b>	<b>Epitope (Immunogen)</b>	<b>Host (Formulation)</b>	<b>Distributer</b>
<b>PDE4B</b>	N-terminal and C-terminal peptides that are common in all PDE4B subtype variants	Polyclonal rabbit (affinity purified IgG)	FabGennix Inc. Frisco, TX, USA
<b>CD11b</b>	Thioglycollated-elicited Peritoneal Macrophages (TPM)	Monoclonal rat (ion exchange chromatography purified IgG)	AbD Serotec, Oxford, UK (MCA711G)
<b>CD11c</b>	Reacts with mouse CD11c, the integrin $\alpha$	Monoclonal Armenian Hamster (ion exchange chromatography purified IgG)	eBioscience, San Diego, CA, USA (14-0114)
<b>CD3</b>	Synthetic peptide comprising aa 156-168 from the cytoplasmic part of the human CD3 $\epsilon$ -chain coupled to thyroglobulin	Polyclonal rabbit (affinity purified IgG)	Dako Cytomation Glostrup, Denmark (A 0452)
<b>Iba 1</b>	Raised against synthetic peptide corresponding to C-terminus of Iba1	Polyclonal rabbit (affinity purified anti-rabbit IgG)	Wako, Neuss, Germany (019-19741)
<b>MBP</b>	Synthetic peptide comprising aa 82-87 (DENPVV)	Monoclonal rat (tissue culture supernatant IgG)	Abcam, Cambridge, UK (ab7349)
<b>Neutrophil, (NIMP-R14)</b>	Neutrophil membrane. Highly purified BALB/c mouse Neutrophils	Monoclonal rat (IgG fraction)	Abcam, Cambridge, UK (ab2557)
<b>GFAP, clone G-A-5</b>	Purified GFAP from pig spinal cord was used as the immunogen	Monoclonal mouse	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany (G 3893)
<b>Biotinylated anti-rabbit IgG (H+L)</b>	Immunoglobulin biotinylated	Goat (affinity purified anti-rabbit IgG)	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA (BA-1000)
<b>Alexa Fluor® 555</b>	Reacts with IgG heavy chains and all classes of immunoglobulin light chains from rabbit	Donkey (affinity purified anti-rabbit IgG)	Molecular Probes, Leiden, The Netherlands (A31572)
<b>Alexa Fluor® 488</b>	Reacts with IgG heavy chains and all classes of immunoglobulin light chains from rabbit	Goat (affinity purified anti-mouse IgG)	Molecular Probes, Leiden, The Netherlands (A-11017)
<b>Alexa Fluor® 488</b>	Reacts with IgG heavy chains and all classes of immunoglobulin light chains from rabbit	Goat (affinity purified anti-rat IgG)	Molecular Probes, Leiden, The Netherlands (A-11006)

PDE, phosphodiesterase; GFAP, glial fibrillar acidic protein; MBP, myelin basic protein



**Supplemental Figure 1.** Immunohistochemistry for glial cells in consecutive spinal cord sections from a 30 days post-immunization mouse. Staining with the PDE4B antibody in mice with EAE was observed in association with areas that demonstrated strong invasion of inflammatory infiltrates. Dual immunostaining localization of PDE4B<sup>+</sup>-cells (red) and (A-C) neutrophils (green), (D-F) GFAP<sup>+</sup>-astrocytes (green) and (G-I) MBP<sup>+</sup>-oligodendrocytes (green). Scale bar = 50  $\mu$ m.

**Supplemental Table 2.** Sequences of primers used for real time RT-PCR.

<b>Gene</b>	<b>Primer sequence</b>	<b>Database number</b>
<b>PDE4A</b>	Sense 5'-CTTCTGCGAGACCTGCTCCA-OH Antisense 5'-GAGTTCCCGGTTTCAGCATCC-OH	NM_019798.5
<b>PDE4B</b>	Sense 5'-GCCACTGGATGAGAGGAGCA-OH Antisense 5'-CCTTTTCCGGTCCCTCAGAA-OH	NM_019840.2
<b>PDE4B2</b>	Sense 5'-CGGCAAGCAAACAATGAAGG-OH Antisense 5'-CTGGCCATAGCCGAGTCTCC-OH	BC023751
<b>PDE4B3</b>	Sense 5'-GTGTGTAACCTGTCAGACAAACCC-OH Antisense 5'-ATCAGGCTGCCTTTGCCTCT-OH	BC049864.1
<b>PDE4D</b>	Sense 5'-ACCGCCAGTGGACGGACCGGA-OH Antisense 5'-CATGCCACGCTCCCGCTCTCGG-OH	NM_011056.2
<b>IL-17A</b>	Sense 5'-GAAGCTCAGTGCCGCA-OH Antisense 5'-TTCATGTGGTGGTCCAGCTTT-OH	NM_010552
<b>FoxP3</b>	Sense 5'-GGCCCTTCTCCAGGACAGA-OH Antisense 5'-CTGATCATGGCTGGGTTGT-OH	NM_054039
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Sense 5'-TGATCCGCGACGTGGAA-OH Antisense 5'-ACCGCCTGGAGTTCTGGAA-OH	NM_013693.2
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Sense 5'-TGCTGATGGGAGGAGATGTCT-OH Antisense 5'-TTTCTTTCAGGGACAGCCTGTT-OH	NM_008337
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Sense 5'-TGGTGTGTGACGTTCCCATTA-OH Antisense 5'-CAGCACGAGGCTTTTTTGTG-OH	NM_008361.3
<b>IL-6</b>	Sense 5'-CCAGTTTGGTAGCATCCATC-OH Antisense 5'-CCGCAGAGGAGACTTCACAG-OH	NM_031168.1
<b>COX-2</b>	Sense 5'-GCCACCAACAATGGCAACA-OH Antisense 5'-CGTACCGGATCAGCTGTGAATT-OH	NM_010927.2
<b>HPRT</b>	Sense 5'-TGGTGAAAAGGACCTCTCGAA-OH Antisense 5'-TCAAGGGCATATCCAACAACA-OH	NM_013556



# Lipopolysaccharide administration *in vivo* induces differential expression of cAMP specific Phosphodiesterase 4B mRNA splice variants in the mouse brain

Emily Johansson<sup>#</sup>, Cristina Sanabra<sup>#</sup>, Roser Cortés, M. Teresa Vilaró and Guadalupe Mengod

Departament de Neuroquímica i Neurofarmacologia, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (CSIC), IDIBAPS, CIBERNED, 08036 Barcelona, Spain.

<sup>#</sup>: Contributed equally to the study

**Keywords:** neuroinflammation, *In situ* hybridization, COX, TNF- $\alpha$ , anatomy

Acceptat a *Journal of Neuroscience Research*



## ABSTRACT

Many inflammatory processes involve cAMP. Pharmacological manipulation of cAMP levels using specific phosphodiesterase (PDE) inhibitors provokes an anti-inflammatory response. The aim of this study was to investigate changes in the pattern and levels of expression of mRNAs coding for the cAMP-specific PDE4 family and subfamilies in mouse brain during the immediate acute immune response provoked by an intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS). PDE4B, and furthermore the splice variants PDE4B2 and PDE4B3 were the only mRNAs that showed altered expression. While PDE4B2 presented increased expression at both 3 and 8 h post-injection, PDE4B3 mRNA showed decreased expression that reached a minimum 8 h post-injection. PDE4B2 mRNA upregulation was mainly observed in endothelial and macrophage/neutrophil cell populations in the leptomeninges, and the downregulation of PDE4B3 was mainly observed in oligodendrocytes throughout the brain. Our results clearly illustrate the distinctive anatomical distribution and cellular localization of the PDE4Bs during neuroinflammation, and emphasize the importance of PDE4B splice-variant-specific inhibitors as therapeutic tools.

## INTRODUCTION

Every day we are exposed to bacteria and viruses that could provoke systemic infection. The negative impact that such infection may have on the central nervous system (CNS) is mediated, among others, by the production of pro-inflammatory cytokines in the periphery, and is normally referred to as sickness behavior (Hart 1988; Konsman et al., 2002). Neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and multiple sclerosis can also be exacerbated by systemic infection (Sly et al., 2001; Buljevac et al., 2002).

Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) plays a significant role as a second messenger in signal-transduction pathways and is regulated by adenylyl cyclases and cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDE). Particular attention has been given to the PDE4 isoform owing to the anti-inflammatory effects observed after its inhibition *in vitro* and *in vivo* (reviewed by Torphy 1998; Banner & Trevethick 2004). However, inhibition of the PDE4 family implies the general inhibition of four PDE4 subfamilies, PDE4A, PDE4B, PDE4C and PDE4D, all of which show tissue- and cell-specific distribution (Cherry & Davis 1999; Pérez-Torres et al., 2000; Miró X et al.,

2002; Reyes-Irisarri et al., 2008) as well as intracellular compartmentalization (Houslay & Adams 2003; Arp et al., 2003). This characteristic provides many opportunities for selective therapeutic targeting (Swinnen et al., 1989; Bender & Beavo 2006) and the potential to reduce the incidence of secondary effects attributed to PDE4 inhibition (Yamamoto et al., 2006; Boswell-Smith et al., 2006). The emetic side effects observed in clinical trials with PDE4 inhibitors (Hebenstreit et al., 1989) are, for example, related to the expression of PDE4 mRNAs present in the area postrema (Takahashi et al., 1999; Pérez-Torres et al., 2000; Mori et al., 2010). Thus, increased knowledge about the anatomical and cellular localization and involvement of the cAMP-specific PDE4 subfamilies during the acute immune response in the brain may improve their therapeutic potential.

PDE4 represents a family of cAMP-specific PDE consisting of four paralog genes (PDE4A–D), each of which can generate multiple splice variants distinguishable by their unique N-terminal sequences (Houslay & Adams 2003). More than 20 transcripts have been identified from the four genes (Conti & Beavo 2007), and these are classified as long, short and super-short

depending on the presence of regulatory regions called upstream conserved regions (UCR1 and UCR2) that are linked to the catalytic unit (Houslay 1998; Conti 2000). The PDE4B2 isoform is a short variant lacking UCR1, while both PDE4B1 and PDE4B3 are long splice variants (Swinnen et al., 1989; Huston et al., 1997). Evidence suggests that the PDE4B gene is the predominant subtype involved in inflammatory induction by lipopolysaccharide (LPS) in mouse monocytes and macrophages (Jin et al., 2005). Furthermore, upregulation of the expression of the PDE4B mRNA splice variant PDE4B2 in rat brain has been reported in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an animal model of multiple sclerosis (Reyes-Irisarri et al., 2007).

We used *in situ* hybridization to study alterations in the mRNA expression of several cytokines together with the PDE4 subfamilies in the mouse brain following systemic injection of LPS. To further identify and characterize the cell populations containing the PDE4B mRNA variations, double *in situ* hybridization studies were performed using several cell markers.

## MATERIAL AND METHODS

### Lipopolysaccharide administration

Six-week-old male C57BL6 mice (15–20 g) were purchased from Charles River Laboratories (France). All

experimental procedures followed the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC), and were approved by the ethics committee of the University of Barcelona and of the Generalitat de Catalunya. Every effort was made to minimize the number of animals used and their suffering. The mice were maintained on a 12-h light/dark cycle at a constant environmental temperature with

**Table 1** List of the oligonucleotides used

mRNA	Oligonucleotide name	Accession number	Bp limits
PDE4A	PDE4A/1	L27057	3649-3693
PDE4B	PDE4B/3	NM_017031	2639-2687
	PDE4B/4	NM_017031	2537-2581
PDE4B1	PDE4B1/4	AF202732	506-550
PDE4B2	PDE4B2/2	L27058	545-589
PDE4B3	PDE4B3/1	U95748	700-744
	PDE4B3/2	U95748	616-660
	PDE4B3/3	U95748	556-600
PDE4B4	PDE4B4/1	AF202733	264-308
	PDE4B4/3	AF202733	171-215
PDE4D	PDE4D/2	NM_017032	1917-1961
TNF- $\alpha$	TNF- $\alpha$ /1	NM_013693	397-441
COX-2	COX-2/1	NM_017232	1848-1893
	COX-2/2	NM_017232	2710-2754
	COX-2/3	NM_017232	446-490
IL-1 $\beta$	IL-1 $\beta$ /1	NM_008361	72-116
VCAM-1	VCAM-1/1	M84487	63-107
	VCAM-1/2	M84487	428-472
	VCAM-1/3	M84487	1107-1151
GFAP	GFAP/1	NM_017009	233-279
	GFAP/2	NM_017009	1199-1248
PAFR	PAFR/1	U04740	124-168
	PAFR/2	U04740	1081-1125
	PAFR/3	U04740	786-840
	PAFR/4	U04740	976-1020
MBP	MBP/1	M25889	179-223
MAP-2	MAP-2/1	NM_013066	195-239

COX, cyclooxygenase; GFAP, glial fibrillary acidic protein; IL, interleukin; MAP, microtubule-associated protein; MBP, myelin basic protein; PAFR, platelet-activating factor receptor; PDE, phosphodiesterase; TNF, tumor necrosis factor; VCAM, vascular cell adhesion molecule.

free access to food and water for one week prior to experimentation.

A dose-response curve for PDE4B mRNA expression was obtained using the following doses of LPS (serotype 055:B5, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany): 0.1, 0.3, 1, 5, 10 mg/kg (n = 3/dose) dissolved in 0.9% NaCl. Based on this dose-response curve and in order to obtain unambiguous mRNA expression for double *in situ* hybridization experiments, 10 mg/kg bacterial LPS was subsequently administered to the mice by intraperitoneal (i.p.) injection. Animals from two separate experiments were killed by cervical dislocation at 1 h and 8 h (n = 5/time point), 3 h and 24 h (n = 10/time point) after injection. Controls were included to evaluate the effect of injection with vehicle (0.9% NaCl) alone (n = 5/experiment). In addition, the selected LPS dose was evaluated via a lethality test (Villa & Ghezzi 2004), in which the animals were monitored until 60 h post-injection (n = 5).

#### **Tissue preparation**

Brains were removed immediately after cervical dislocation, rapidly frozen on dry ice and stored at -20 °C. Coronal tissue sections of whole brain (14 µm thick) were cut on a microtome-cryostat (Microm HM500 OM, Walldorf, Germany), thaw-mounted onto slides coated with 3-aminopropyltriethoxysilane (Sigma-Aldrich), and stored at -20 °C until further processing.

#### **Hybridization probes**

The oligonucleotide probes complementary to the mRNAs coding for the different PDE inflammatory and cell markers are shown in Table 1. The mRNA regions selected for each PDE4B splice variant shared no similarities (Reyes-Irisarri et al., 2008). The hybridization conditions used to detect all mRNAs are described elsewhere (Pérez-Torres et al., 2000; Miró et al., 2001; Reyes-Irisarri et al., 2005). All oligonucleotides

were synthesized and then purified by high-performance liquid chromatography (biomers.net GmbH, Ulm, Germany and Isogen Bioscience BV, Maarsden, The Netherlands). The specificity of the autoradiographic signal obtained in the *in situ* hybridization histochemistry experiments was confirmed by a series of routine controls as previously described (Pompeiano et al., 1992).

Oligonucleotides were labeled at their 3'-end using [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P] dATP (3000 Ci/mmol, New England Nuclear, Boston, MA, USA) with recombinant terminal deoxynucleotidyltransferase (TdT) (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany). All vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), glial fibrillary acidic protein (GFAP), microtubule-associated protein (MAP-2), myelin basic protein (MBP), and platelet-activating factor receptor (PAFR) oligonucleotides (100 pmol) were individually non-radioactively labeled with TdT (Roche Diagnostics GmbH) and digoxigenin (DIG)-11-dUTP (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) according to a previously described procedure (Schmitz et al., 1991). Labeled probes were purified using ProbeQuant G-50 Microcolumns (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

#### ***In situ* hybridization histochemistry**

The protocols for single- and double-label *in situ* hybridization histochemistry were based on previously described procedures (Tomiya et al., 1997; Landry et al., 2000) and have been published elsewhere (Serrats et al., 2003; Reyes-Irisarri et al., 2007).

For film autoradiography, hybridized sections were exposed to Biomax-MR (Kodak, Rochester, NY, USA) films for 2–20 days at -70 °C with intensifying screens.

Double *in situ* hybridized sections were treated as described in (Landry et al., 2000). They were then exposed in the dark at 4 °C for 6 weeks, developed in a Kodak D19 (Kodak) developer for 5 min, and fixed in Ilford Hypam fixer (Ilford).

#### *Analysis of the results*

For single *in situ* hybridization experiments, semi-quantitative measurements of film optical densities were conducted using an AIS computerized image system (Imaging Research, St Catharines, Ontario Canada). Sections were stained with cresyl-violet to identify brain structures with the aid of the Franklin and Paxinos Mouse Brain Atlas (Franklin & Paxinos 2007). The optical densities corresponding to the following regions were measured on autoradiograms obtained from coronal tissue sections: *Cornu ammonis* fields (CA1–2, CA3), dentate gyrus (DG), hippocampal fissure (hf), subfornical organ (SFO), cingulate cortex (Cg), nuclei of the inferior colliculus (IC) and leptomeninges (lepto.).

Statistical comparisons using the factors brain region and treatment were carried out by separate two-way analyses of variance followed by *post hoc* analysis (Bonferroni's test) for treatment and time for each brain region. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA).

For double *in situ* hybridization experiments, tissue sections were examined in an Olympus BX51 Stereo Microscope (Olympus, Tokyo, Japan) equipped with bright- and dark-field condensers for transmitted light. Hematoxylin & eosin staining was used to determine whether the PAFR-positive cells in the parenchyma corresponded to infiltrating neutrophils. VCAM-1-, PAFR-, GFAP-, MBP- and MAP-2-positive cells exhibited a dark

precipitate (alkaline phosphatase reaction product) surrounding or covering the nucleus. PDE4B2 and PDE4B3 mRNA hybridization signals were considered positive when the accumulation of silver grains over the stained cellular profiles was visually estimated to be four times greater than that of the background. Quantification was performed by recording the percentage of DIG-positive cells also expressing PDE4B2 or PDE4B3 mRNA. Cells were counted using the Visiopharm Integrator System (Visiopharm Software, Hørsholm, Denmark) for stereological analysis.

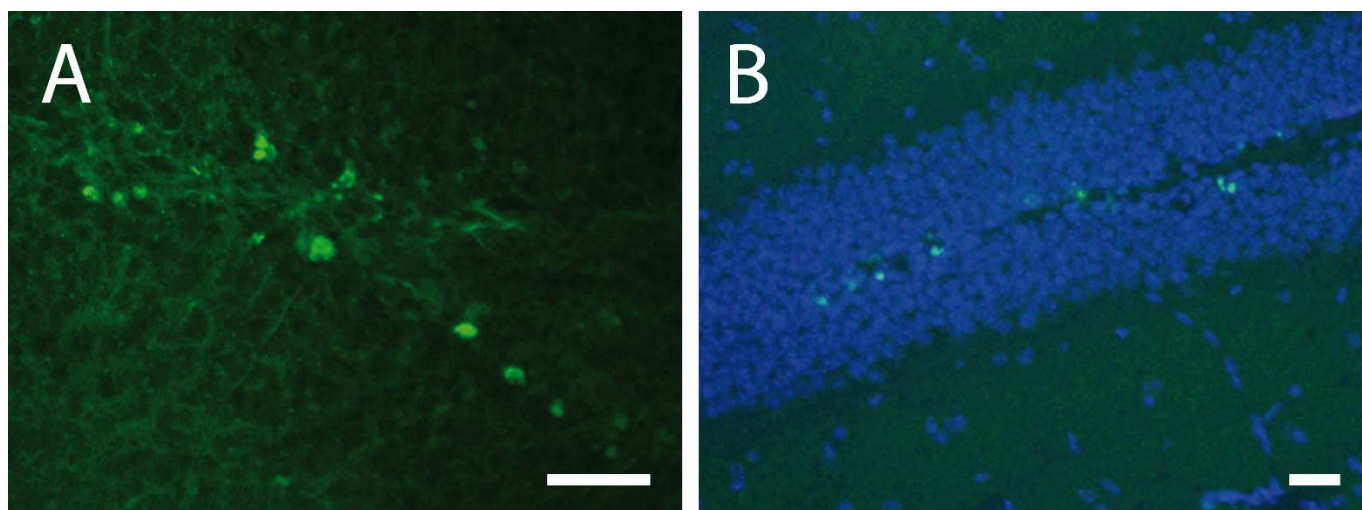
#### **TUNEL and Fluoro-Jade B staining**

DNA fragmentation was histologically examined using the *in situ* Apoptosis Detection System Fluorescein (Promega, Madison, WI, USA). Sections were stained according to the manufacturer's recommendations. Sections were mounted using VECTASHIELD® + DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) to stain the nuclei.

For Fluoro-Jade staining sections were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min and rinsed in distilled water three times for 5 min. They were then immersed in 80% ethanol/1% sodium hydroxide for 5 min, followed by 70% ethanol and distilled water for 2 min each. The slides were then transferred to a solution of 0.06% potassium permanganate for 10 min to block background staining. After an additional water rinse, the sections were stained for 20 min in 0.0004% Fluoro-Jade B (Millipore, Temecula, CA, USA) and 0.1% acetic acid. The slides were then rinsed in water, dried, soaked in xylene, and mounted with Entellan.

#### **Lectin staining and immunohistochemistry**





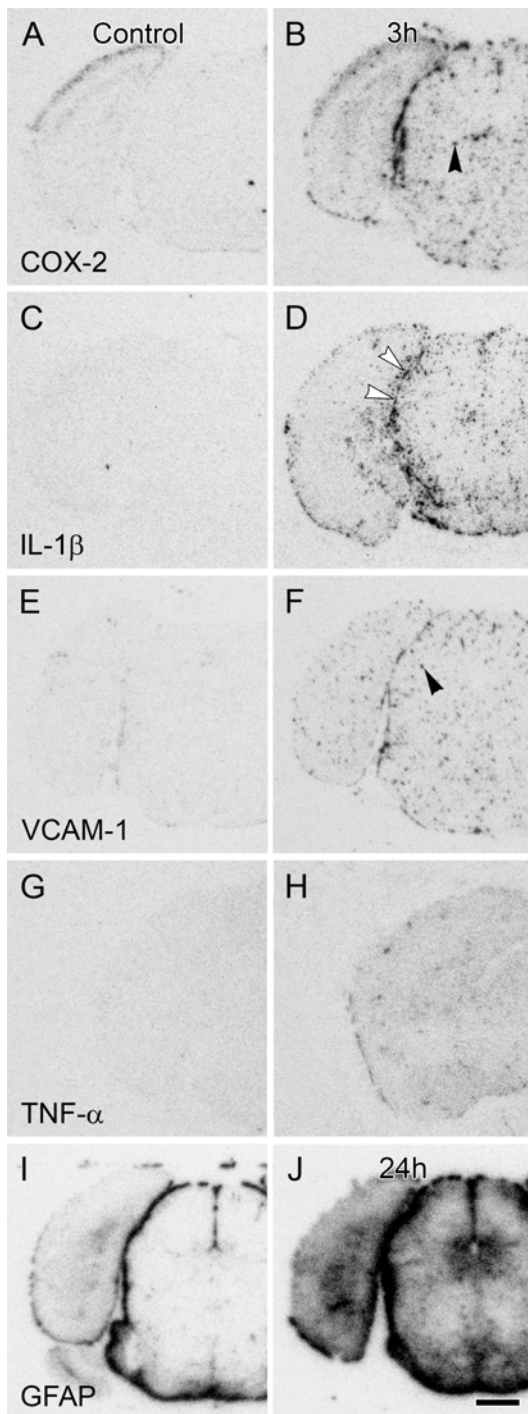
**Figure 1.** Presence of necrotic and apoptotic cells following LPS administration. Photomicrographs were taken from coronal sections of the dentate gyrus of animals sacrificed 24h post-injection. (A) Fluoro-Jade B, (B) TUNEL and DAPI staining. LPS, lipopolysaccharide. Scale bar =100  $\mu$ m.

For detection of T-cells a polyclonal rabbit antibody was used to stain anti-human CD3 (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark, # A 0452) prepared against a synthetic peptide comprising amino acids 156–168 from the cytoplasmic part of the human CD3 $\epsilon$ -chain coupled to thyroglobulin. *Lycopersicon esculentum* (Tomato) lectin (Vector Laboratories) was used to stain microglial cells. In brief, sections were fixed at 4 °C in 4% paraformaldehyde and then incubated in 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich) in 1X PBS. Preincubation and incubation with anti-human CD3 and biotinylated goat anti-rabbit antibody (Vector Laboratories) or lectin and ExtrAvidin-peroxidase (Sigma-Aldrich) were carried out in a 1x PBS solution containing 2% normal goat serum (Vector Laboratories). The primary antibody, anti-human CD3, was incubated for 1 h at 37 °C and lectin was incubated overnight at 4 °C, followed by incubation with biotinylated secondary antibody or ExtrAvidin-peroxidase respectively, and subsequent incubation in ABC solution (Vectastain Elite ABC Kit; Vector Laboratories) according to the manufacturer's instructions. The color reaction was performed using

diaminobenzidine tetra hydrochloride (DAB) solution (0.05 M Tris-HCl pH 7.0, 0.3 mg/ml DAB (Sigma-Aldrich), 10  $\mu$ l/ml dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich), 0.64 mg/ml NaN<sub>3</sub> (Merck, Darmstadt, Germany) and 0.06  $\mu$ l/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich) at room temperature for 5 minutes each. The sections were mounted in Mowiol (Calbiochem).

#### Preparation of the figures

Images from film autoradiograms were obtained using a Wild 420 macroscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with a digital camera (DXM1200 F, Nikon, Tokyo, Japan) and ACT-1 Nikon software. Microphotography was performed with an Olympus BX51 Stereo Microscope (Olympus) equipped with a digital camera (DP71, Olympus). Figures were assembled using Adobe Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA, USA); only contrast and brightness were adjusted to optimize the images. Figures illustrating double *in situ* hybridization and magnification of lectin staining consist of high-magnification images taken in multiple (3–4) focal planes, merged using Cell<sup>^</sup>P analysis software (Olympus).



**Figure 2.** Expression of inflammatory markers and GFAP mRNAs following LPS administration. Macroscopic photographs of film autoradiographic show localization of the mRNAs coding for the inflammatory markers, COX-2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , VCAM-1 and GFAP following i.p. LPS administration in mouse coronal sections. (B,D,F,H) COX-2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and VCAM-1 mRNAs expression is prominent in the leptomeninges (white arrowheads) and in blood vessels (black arrowheads) 3h after LPS administration. (J) GFAP mRNA hybridization levels show a later response with the maximum alterations observed 24h after LPS provoked immune activation. (A,C,E,G,I): Control: Saline administered i.p. (B,D,F,H): Animals treated i.p. with LPS 3 hours (J): 24 hours treatment. COX, cyclooxygenase; GFAP, glial fibrillary acidic protein; IL-1 $\beta$ , interleukin; LPS, lipopolysaccharide; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor; VCAM, vascular cell adhesion molecule. Scale bar = 5 mm.

## RESULTS

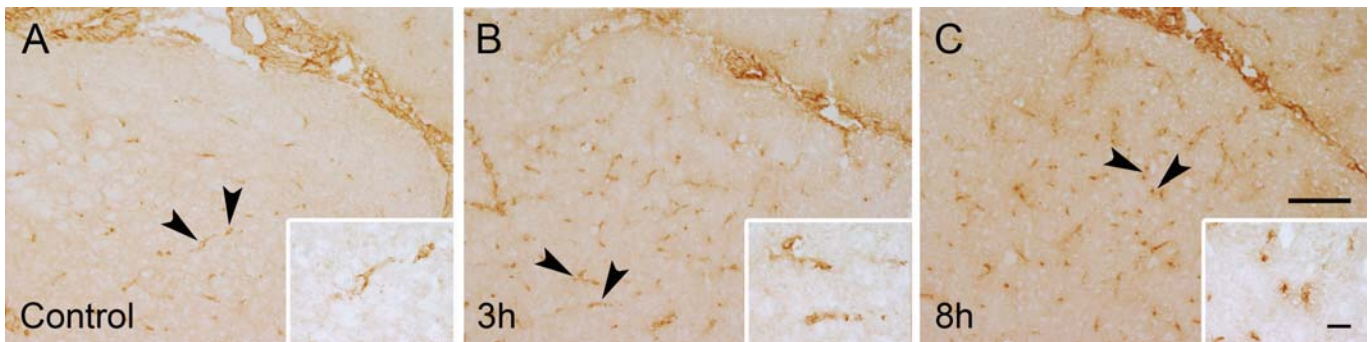
No severe effects on cell survival were observed 24 h after LPS administration. A number of necrotic cells were detected in the dentate gyrus of the hippocampus when tissue sections were stained with Fluoro-Jade B (Fig. 1A). Deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-nick end labeling (TUNEL) experiments also revealed a few apoptotic cells in the same brain area (Fig. 1B). No other brain region investigated showed positive staining for either Fluoro-Jade B or TUNEL 24 h after injection (data not shown). The lethality test showed that the LPS dose provoked septic shock in animals at a later time point based on a mortality rate of approximately 80%, 60 h after LPS injection.

### Expression of inflammatory markers following LPS administration

To validate our animal model of acute immediate neuroinflammation we first analyzed the response of four typical inflammatory markers. Visual analysis of images from film autoradiograms obtained after *in situ* hybridization histochemistry showed a time-dependent response. For cyclooxygenase-2 (COX-2), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and VCAM-1 mRNA, the initial increase in expression was observed 1 h after administration, followed by a peak at 3 h (Fig. 2A–H), and a subsequent decline after 8 and 24 h (data not shown). The highest level of hybridization for GFAP mRNA was visible at 24 h (Fig. 2H).

Microglial activation was observed in the circumventricular organs (CVOs) and brain regions proximal to the leptomeninges in response to LPS administration (Fig. 3), and morphological changes were identified 3 h and 8 h post-injection (Fig. 3B, C). No





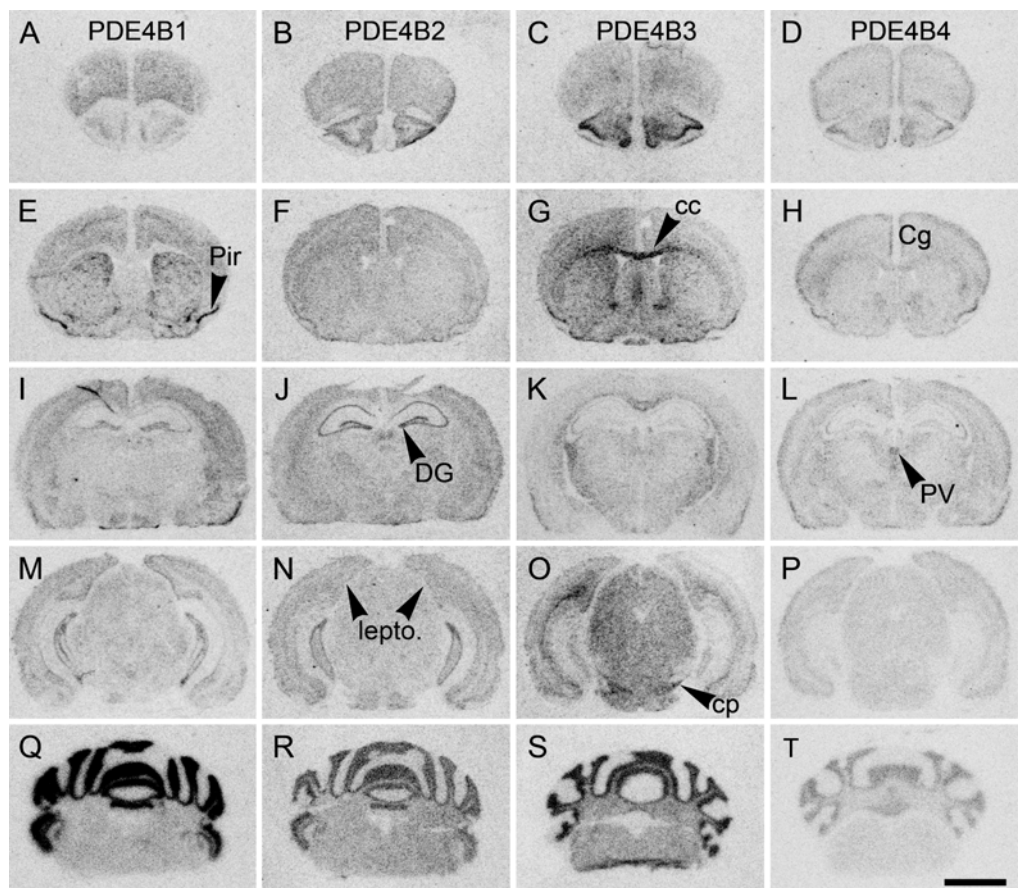
**Figure 3.** Activation of microglia following LPS administration. Analysis of the effect of LPS administration on lectin-stained microglia. Photomicrographs were taken of coronal sections of the leptomeninges and the immediately proximate area of animals sacrificed at (B) 3h and (C) 8h post-injection. Note the morphological changes observed in microglial ramification following LPS administration (Black arrowheads). (A) Control: Saline administered i.p.. LPS, lipopolysaccharide. Scale bars =100 µm and 1 µm.

infiltrating lymphocytes (CD3<sup>+</sup>) were observed in any of the brain regions analyzed (data not shown).

**Expression of cAMP-specific PDE mRNAs following LPS administration**

We first identified the basal mRNA expression of the PDE4B family (data not shown) and the four PDE4B splice variants (Fig. 4) in the mouse brain. Following systemic LPS injection the relative optical densities showed no changes in mRNA expression for PDE4A, PDE4D or the PDE4B splice variants PDE4B1 or PDE4B4 (data not shown). We then focused on the anatomical location of the mRNA alterations observed for PDE4B and the splice variants PDE4B2 and

PDE4B3 following LPS administration (Fig. 5 and 6). Alterations in the mRNA expression of PDE4B2 were detected even following a low dose of LPS (0.3 mg/kg) (data not shown); however, the enhanced

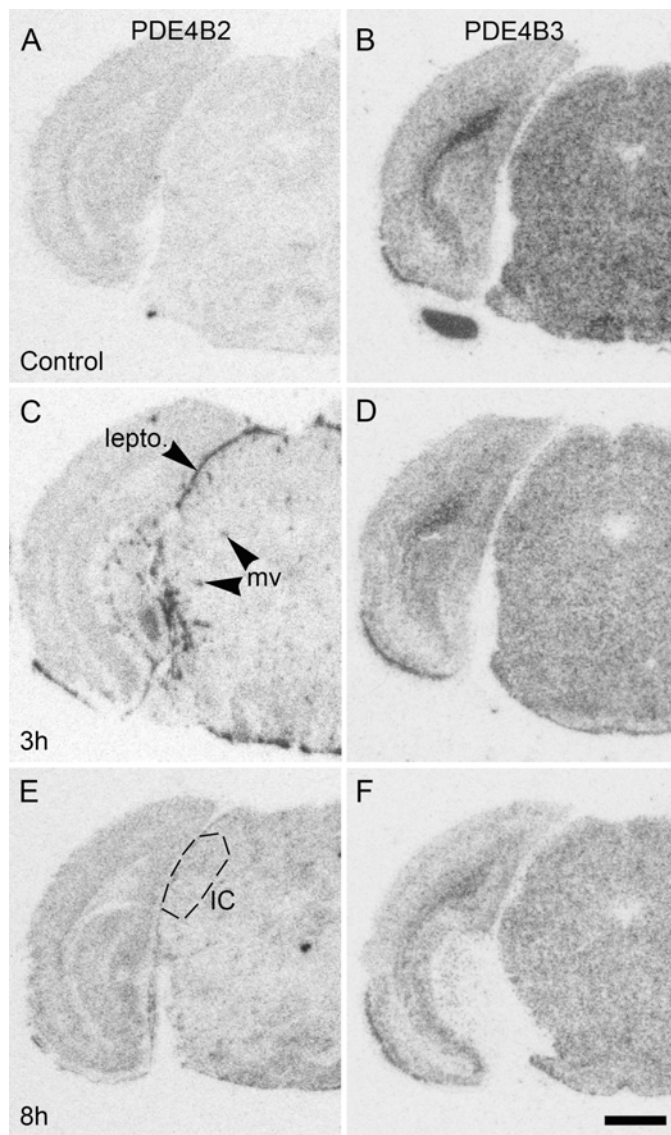


**Figure 4.** Expression of PDE4B splice variant mRNAs in mouse brain. Macroscopic photographs of film autoradiographic images of coronal sections showing mRNA hybridization pattern of PDE4B splice variants (A,E,I,M,Q) PDE4B1, (B,F,J,N,R) PDE4B2, (C,G,K,O,S) PDE4B3, and (D,H,L,P,T) PDE4B4 under basal conditions in C57BL6 mice. Note the strong labeling in the cerebellar granular layer for all four variants. cc, corpus callosum; Cg, cingulate cortex; cp, cerebral peduncle; DG, dentate gyrus; lept., leptomeninges; LPS, lipopolysaccharide; Pir, piriform cortex and PV, paraventricular thalamic nuclei. Scale bar = 5mm.



effect on mRNA expression obtained with the higher dose used here facilitated the anatomical description and analysis of our results.

### Leptomeninges



**Figure 5.** Expression of PDE4B2 and PDE4B3 mRNAs following LPS administration. Macroscopic photographs of film autoradiographic images of mouse coronal sections showing alterations in mRNA hybridization levels of PDE4B2 and PDE4B3 splice variants in (A,B) control animals (saline administered i.p.) and (C,D) LPS treated animals 3 hours and (E,F) 8 hours after injection. (C) Clearly augmented mRNA expression in the leptomeninges (lepto.) is observed for the PDE4B2 splice variant 3h after injection, (D) whereas mRNA hybridization levels of the PDE4B3 splice variant show a slight downregulation at this time point. (E) 8h after injection an overall increase in hybridization levels for the PDE4B2 splice variant is observed in the parenchyma (IC), the areas in close contact with the brain exterior such as the leptomeninges and brain microvessels (mv). Note the general decrease in mRNA expression in whole brain section for (F) the PDE4B3 splice variant 8h after LPS administration compared to (B) saline treated mice. IC, nuclei of the inferior colliculus; lepto., leptomeninges; LPS, lipopolysaccharide; mv, microvessel PDE, phosphodiesterase. Scale bar = 5mm.

The leptomeninges are in close contact with the exterior of the brain, and thus may show an early reaction to acute immediate inflammation. Under basal conditions, none of the PDE4B mRNAs investigated were expressed in the leptomeninges (Fig. 4M–P). The observed upregulation of PDE4B mRNA expression (Fig. 5A,D,G) was reflected in the increased intensity of PDE4B2 mRNA expression as early as 1 h after LPS administration, followed by a peak at 3 h (Fig. 5E, 6A) and a marked return towards basal levels 24 h post-injection (Fig. 6A). Interestingly, there was a slight trend towards a reduction in PDE4B3 mRNA expression after 8 h (Fig. 5I and 6B), followed by recovery at 24 h (Fig. 6B) in this area.

An increase in both VCAM mRNA-positive cells (endothelial cells) and PAFR mRNA-positive cells (macrophages/neutrophils) was observed in the leptomeninges in response to peripheral inflammation. Double *in situ* hybridization was used to investigate whether the augmented PDE4B2 mRNA expression was associated with the increase in inflammatory cell populations. There was notable upregulation of the expression (61% and 56%, 3 and 8 h following LPS injection respectively) of PDE4B2 mRNA in the VCAM mRNA-positive cells (endothelial cells) (Fig. 7A) following their appearance after LPS administration. Likewise, the PAFR-positive cell population expressed this mRNA at a similar level (around 50%) (Fig. 7B), regardless of the time since LPS injection (Table 2).

### Inferior colliculus

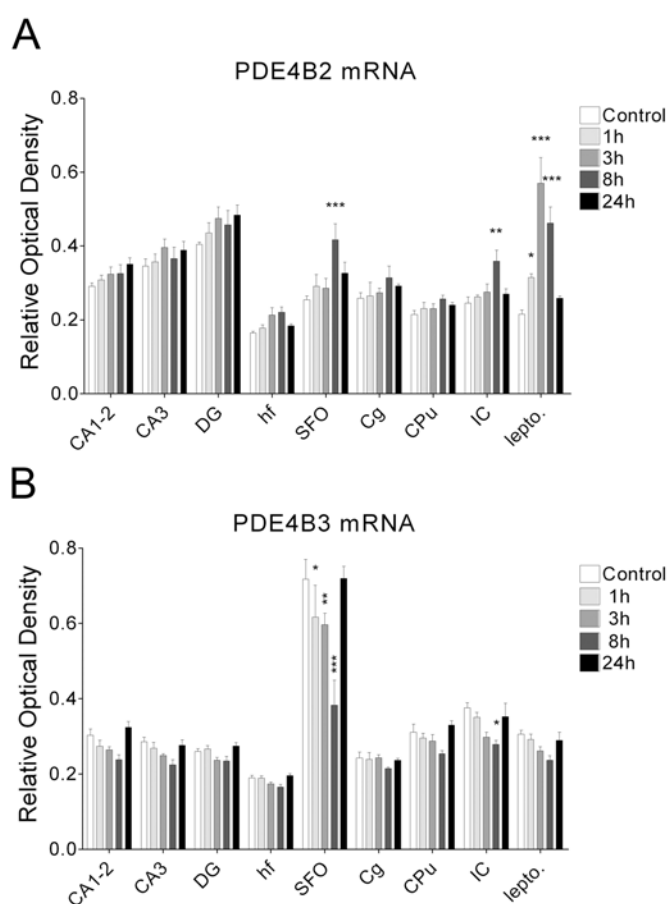
This area consists of the external cortex and the nucleus of the brachium of the inferior colliculi (IC). The IC was used here as an example of the parenchyma proximal

to areas in close contact with the exterior of the brain. Under basal conditions the expression of PDE4B splice variant mRNAs in this area was moderate to low except for PDE4B3, which showed higher levels of hybridization (Fig. 4M–P).

Dark patches observed 3 h after injection demonstrated that the mRNA expression of PDE4B2 was upregulated in and around microvessels in the IC (Fig. 5E); 8 h post-injection a clear increase was observed in this entire area (Fig. 5H and Fig. 6A). Semiquantitative analysis revealed significant downregulation of PDE4B3 mRNA expression 8 h post-injection, followed by a return to basal levels at 24 h (Fig. 6B).

In this brain area PAFR-mRNA-positive cells and astrocytes (GFAP-mRNA-positive) showed the highest percentage of co-expression with PDE4B2 mRNA after 3 h, whereas all three cell populations (microglia/macrophages, astrocytes and activated endothelial cells) investigated expressed around 35% of PDE4B2 mRNA 8 h after LPS administration (Table 2). The PAFR-positive cells in this area likely represent microglia and infiltrating macrophages and not neutrophils, since no recruitment/infiltration of these was observed with hematoxylin and eosin staining (data not shown).

With regards PDE4B3 mRNA, oligodendrocytes positive for the mRNA coding for MBP expressed this splice variant abundantly (around 70–80%) (Fig. 8A), with reduced co-expression observed following LPS injection. A relatively constant percentage of neurons (MAP-2-positive cells) were positive for PDE4B3 mRNA in this region (Fig. 8B), with no distinction between time points following LPS-injection or in the control (Table 2). The number of

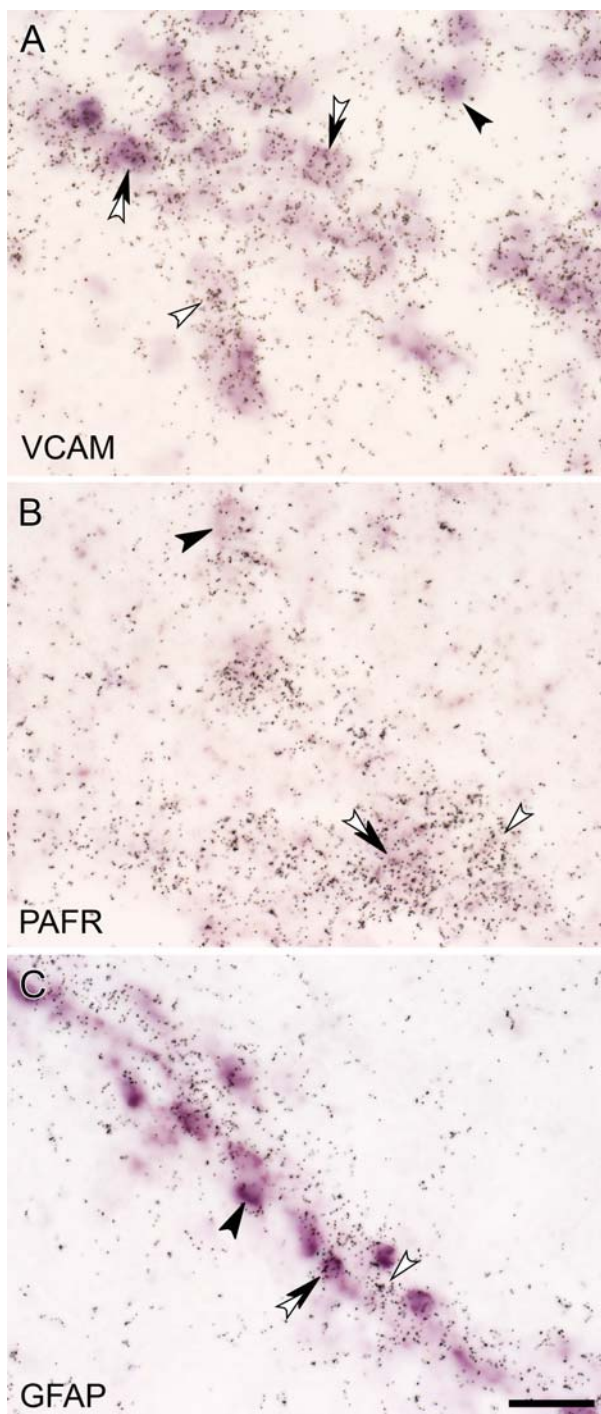


**Figure 6.** Alterations in expression of PDE4B2 and PDE4B3 mRNA following LPS administration. Effects of LPS administration on the mRNA expression of PDE4B splice variants (A) PDE4B2 and (B) PDE4B3 in different mouse brain areas 1, 3, 8 and 24h post-injection. Relative optical densities of the mRNA levels in autoradiographic films were determined with AIS computerized image analysis system. Data show the mean  $\pm$  SD (n = 5 mice/group). Note the opposite effects provoked by LPS administration on mRNA expression for the two PDE4B splice variants. Statistically significant differences between the LPS-stimulated and the control groups are represented by \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001; Bonferroni posttest. CA1-2, CA3, fields of Cornu ammonis; Cg, cingulate cortex; CPu, caudate putamen; DG, dentate gyrus; hf, hippocampal fissure; IC, nuclei of the inferior colliculus; lept., leptomeninges; LPS, lipopolysaccharide; PDE, phosphodiesterase; SFO, subfornical organ.

cells counted was similar in control and LPS-injected animals.

### Subfornical organ and hippocampal formations

We chose the SFO as an example of one of the CVOs, a brain region lacking a blood–brain barrier, whereas the hippocampal formations were investigated due to their high density of microvessels. Significant alterations in PDE4B2 and PDE4B3 mRNA expression were seen in the SFO (Fig. 6).



**Figure 7.** Characterization of cells displaying LPS-altered expression of PDE4B2. Cellular localization of PDE4B2 mRNA in activated endothelial, microglial and astrocytic cell populations in mouse leptomeninges 3h post-injection. High-magnification bright-field microphotographs of emulsion dipped sections, simultaneously showing mRNA visualized by double in situ hybridization using  $^{33}\text{P}$ -labeled oligonucleotides complementary to the mRNA coding for PDE4B2 (clusters of dark silver grains), and DIG-labeled oligonucleotides (dark-purple precipitate) for (A) VCAM mRNA, endothelial cells, (B) PAFR mRNA, microglial/macrophage cells, or (C) GFAP mRNA, astrocytes. Black arrowheads point to digoxigenin-labeled cells, white arrowheads to radioactively-labeled cells and double white and black arrowheads to double-labeled cells. GFAP, glial fibrillary acidic protein; LPS, lipopolysaccharide; PAFR, platelet-activating factor receptor; PDE, phosphodiesterase; VCAM, vascular cell adhesion molecule. Bar = 20 $\mu\text{m}$ .

In the hippocampus there was a trend for increased PDE4B2 mRNA expression as early as 1 h after LPS administration, with a sustained increase at all time points after administration (Fig. 6A). On the contrary, for PDE4B3 mRNA, an overall trend for downregulation was observed, beginning 1 h post-injection (Fig. 6B).

#### *Cingulate cortex*

The Cg (anterior) also represents part of the parenchyma proximal to areas in close contact with the brain exterior. In control animals, PDE4B2 and PDE4B4 mRNA showed high levels of hybridization in the external granule cell layer whereas uniform expression was observed in other Cg areas (Fig. 4F and H). The mRNA expression of the PDE4B1 and PDE4B3 splice variants was similar in the cortical layers even though PDE4B1 showed a somewhat marbled hybridization pattern (Fig. 4E and 4G). PDE4B3 mRNA was readily expressed in oligodendrocytes (around 70%) in control animals (Table 2), and reduced co-expression was observed after LPS administration at both time points investigated (data not shown), similar to that observed in the IC. The neuronal cell population expressed PDE4B3 mRNA moderately (around 40%) in the Cg of both treated and untreated animals (Table 2). The number of cells counted was similar in control and LPS-injected animals.

## DISCUSSION

Activation of the immune response following systemic infection often results in neuroinflammation and consequently in negative effects on the CNS (Park & Shin 1996; Villa & Ghezzi 2004; Semmler et al., 2005). The objective of our study was to analyze the effect of acute immediate neuroinflammation on PDE4 mRNA



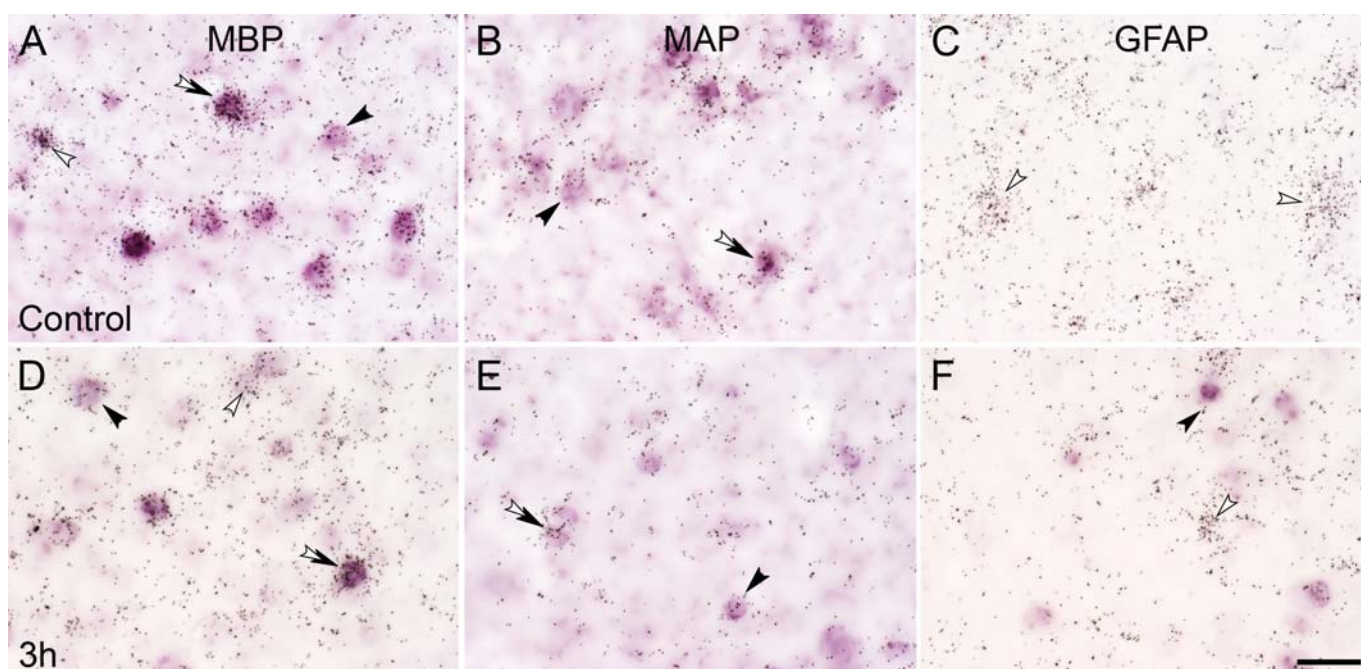
**Table 2** Quantification of the presence of PDE4B2 or PDE4B3 mRNA in different cellular populations

	PDE4B2						PDE4B3					
	Leptomeningeal cells			Nuclei of the inferior colliculus			Cingulate Cortex			Nuclei of the inferior colliculus		
	Control	3h	8h	Control	3h	8h	Control	3h	8h	Control	3h	8h
VCAM	ND	61 ± 8	56 ± 13	ND	17 ± 13	35 ± 11						
PAFR	17 ± 15	54 ± 14	44 ± 7	23 ± 5	28 ± 7	39 ± 8						
GFAP	9 ± 7	37 ± 11	23 ± 8	ND	53 ± 14	33 ± 13	ND	ND	ND	ND	7 ± 2	8 ± 1
MBP							80 ± 3	55 ± 13	59 ± 9	71 ± 1	53 ± 6	40 ± 4
MAP							35 ± 14	43 ± 1	36 ± 10	44 ± 8	35 ± 13	38 ± 7

Quantification was performed in leptomeninges, cingulate cortex and nuclei of the inferior colliculus of mice sacrificed, 3 and 8 h after intra peritoneal LPS administration and control animals. Data are the mean ± SD of five animals and represent the percentage of counted cells, endothelial cells (VCAM), microglia/macrophages (PAFR), astrocytes (GFAP), oligodendrocytes (MBP) and neurons (MAP), expressing PDE4B2 or PDE4B3 mRNA. Each percentage was determined from a mean of 61.1 cells, except for VCAM and GFAP positive cells in the nuclei of the inferior colliculus and in the leptomeningeal areas of control animals where the mean was 28.7 cells (5284 cells counted). GFAP, glial fibrillary acidic protein; MAP, microtubule-associated protein; MBP, myelin basic protein; ND, not detected; PAFR, platelet-activating factor receptor; PDE, phosphodiesterase; VCAM, vascular cell adhesion molecule.

transcription in the brain. The importance of these enzymes in regulating cAMP levels during the inflammatory process in the peripheral nervous system is well established (Jin & Conti 2002; Jin et al., 2005; Reyes-Irisarri et al., 2007; Reyes-Irisarri et al., 2008). Our results provide evidence of their importance in the central nervous system.

We found that the PDE4B subfamily and the two splice variants PDE4B2 and PDE4B3 were the only cAMP-specific PDE4s that showed altered mRNA expression in mouse brain in response to neuroinflammation. The increase in hybridization levels of the PDE4B2 isoform complements previous results for rat brain (Reyes-Irisarri et al., 2008). However, to our knowledge, the decrease in mRNA



**Figure 8.** Characterization of cells displaying LPS-altered expression of PDE4B3. Cellular localization of PDE4B3 mRNA (cluster of dark silver grains) in, (A,D) oligodendrocytes, MBP mRNA positive cells; (B,E) neurons, MAP mRNA positive cells and (C,F) astrocytes, GFAP mRNA positive cells in mouse brain parenchyma (IC) in control and 3h post-injection. Black arrowheads point to digoxigenin-labeled cells (dark-purple precipitate), white arrowheads to radioactively-labeled cells and double white and black arrowheads to double-labeled cells. Note the reduction in PDE4B3 mRNA after LPS injection (D,E,F). GFAP, glial fibrillary acidic protein; LPS, lipopolysaccharide; MAP, microtubule-associated protein; MBP, myelin basic protein; PDE, phosphodiesterase. Bar = 20µm.

expression of the PDE4B3 splice variant observed here has not been described previously. Additionally, our results show that PDE4B2 mRNA upregulation was observed in all inflammatory cell populations investigated, namely microglia/macrophages, astrocytes and activated endothelial cells, with a time-dependent effect. Given the generally high expression of PDE4B3 mRNA under basal conditions throughout the brain we postulated that the observed reduction would probably be detected in cell populations present in the healthy brain. In accordance with this, oligodendrocytes abundantly expressed PDE4B3 mRNA with reduced levels of expression observed following acute neuroinflammation.

We should point out that the high dose of LPS used provokes experimental septic shock at later time points, leading to apoptosis in the rodent brain (Khan et al., 2002; Semmler et al., 2005), and that this is important when considering the pharmacological applications of this study. However, the fact that even a low LPS dose provokes alterations in the mRNA expression of PDE4B splice variants illustrates the relevance of this work.

#### **Involvement of PDE4B2 mRNA during acute inflammation in mouse brain**

Our results, together with other reports (Graeber & Streit 1990; Breder et al., 1994; Breder & Saper 1996; Elmquist et al., 1997; Quan et al., 1998a; Quan et al., 1998b; Laflamme et al., 1999; Schiltz & Sawchenko 2002), suggest the basic involvement of leptomeningeal cells during the initial-phase response of acute neuroinflammation, followed by activation of the immune response in brain areas in close proximity, leading to an extended cellular response

throughout the brain. The upregulation observed in brain areas proximate to the leptomeninges and other areas of the parenchyma in close contact with the CVOs might partly be explained by cross-talk between the periphery and the CNS (reviewed in Johnson & Gross 1993). Furthermore, direct uptake of LPS through the BBB-endothelium has been suggested in mice after high peripheral LPS doses, although the exchange rate was much lower in whole brain compared to BBB-deficient areas (Kloss et al., 2001).

COX-2 and IL-1 $\beta$  hybridization patterns showed a clear initial-phase increase in mRNA expression, further confirming neuroinflammation (Elmquist et al., 1997; Quan et al., 1998b; Schiltz & Sawchenko 2002), and this response was reflected in the patterns observed here for PDE4B2 mRNA upregulation. In rat brain, COX-2 is principally induced in perivascular cells and moderately induced in endothelial cells following LPS administration (Elmquist et al., 1997; Schiltz & Sawchenko 2002). Our results showed that the initial PDE4B2 mRNA upregulation was mainly located in endothelial and macrophage/microglia cell populations in the leptomeninges. The patchy pattern observed around microvessels further suggests a perivascular location of the upregulated mRNA. However, no expression of COX-2 was reported in CVOs after inflammatory induction (Quan et al., 1998a), although such brain areas show a strong increase in PDE4B2 mRNA following LPS administration. COX-2 transcription is induced by IL-1 $\beta$  (Laflamme et al., 1999) and has rate-limiting effects on prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) production (reviewed in Goppelt-Struebe 1995). Furthermore, the augmenting effect that

PGE<sub>2</sub> has on intracellular cAMP levels has been shown to have a direct impact on PDE4B2 mRNA expression in cell cultures (Oger et al., 2002), suggesting that COX-2 might be an important transcriptional regulator for PDE4B2 mRNA during the acute immediate immune response in the CNS. However, no modification of PDE4B2 mRNA expression following LPS administration was observed in preliminary results from our laboratory when the mice were treated with a well-known COX inhibitor, Indomethacin. Altogether these data suggest that PGE<sub>2</sub> is not critical for activation of the cAMP cascade and subsequent induction of PDE4B2 mRNA transcription (D'Sa et al., 2002) in this model of acute neuroinflammation.

PDE4B2 mRNA expression in the parenchyma, which we report here, is comparable to the reported upregulation of the proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$  observed in neuronal cell groups adjacent to CVOs during the late phase of the cerebral response to LPS (Breder et al., 1994). The importance of the PDE4B2 splicing form in the induction of TNF- $\alpha$  secretion by circulating leukocytes following LPS administration has been demonstrated previously (Jin & Conti 2002). TNF- $\alpha$  is mainly released by macrophages and leukocytes in the periphery and by microglia and infiltrating leukocytes and macrophages in the CNS (Elmqvist et al., 1997; Jin et al., 2005; Lambertsen et al., 2009). Even though no cellular infiltration (lymphocytes and neutrophils) was detected after LPS administration, upregulation of PDE4B2 mRNA expression was observed 8 h post-injection in the parenchyma, suggesting that microglia/macrophages could be involved. Furthermore, activated astrocytes are also known to release TNF- $\alpha$ , although at much

lower levels than microglia (Liberto et al., 2004). We observed upregulation of GFAP mRNA 8 h post-injection, with expression continuing to increase after 24 h, and we also showed that both activated astrocytes and microglia were positive for PDE4B2 mRNA in the parenchyma. Taken together, these data suggest that PDE4B2 could play an important role in TNF- $\alpha$  secretion in the brain, as in the periphery.

Further biochemical analyses in cell cultures would form an interesting step towards understanding the induction of PDE4B2 mRNA transcription by inflammatory components.

#### **Involvement of PDE4B3 during acute inflammation in mouse brain**

Our results, together with previous reports of the constitutive expression of PDE4B3 mRNA in primary cerebral cortical neuronal cultures (D'Sa et al., 2002) and its reported expression during memory consolidation (Ahmed & Frey 2003) imply a more neuronal role for this PDE4B splice variant than that observed for PDE4B2. However, the reduced PDE4B3 mRNA levels observed during acute neuroinflammation suggest involvement of PDE4B3 in the immunological reaction.

Decreased PDE4B3 mRNA expression was reflected in the lower percentage of co-localization with the oligodendrocyte population in the Cg and IC after LPS administration. The release of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  from astrocytes and microglia can induce oligodendrocyte death (D'Souza et al., 1996; Cai et al., 2003), suggesting that a decrease in oligodendrocytes might provoke the downregulation of PDE4B3 expression. However, total cell counts were similar at all time points and were comparable to control animals, indicating that the decreased mRNA expression in



oligodendrocytes is related to a lower transcription level. Given the proven anti-inflammatory effect of PDE4B inhibition (reviewed in Banner & Trevethick 2004), it seems reasonable to suggest that the natural downregulation of PDE4B3 might have neuroprotective consequences.

In summary, we show that the mRNA expression of the PDE4B splice variants PDE4B2 and PDE4B3 is clearly and differentially altered in mouse brain following peripheral inflammation. The results obtained here substantiate the possibility of more precise pharmacological regulation at a cellular level via splice-variant-specific inhibition.

#### Acknowledgements

We thank Rocío Martín for technical assistance and Robyn Rycroft for English corrections.

#### REFERENCES

Ahmed, T., Frey, J.U., 2003. Expression of the specific type IV phosphodiesterase gene PDE4B3 during different phases of long-term potentiation in single hippocampal slices of rats in vitro. *Neuroscience* 117, 627-638.

Arp, J., Kirchoff, M.G., Baroja, M.L., Nazarian, S.H., Chau, T.A., Strathdee, C.A., Ball, E.H., Madrenas, J., 2003. Regulation of T-cell activation by phosphodiesterase 4B2 requires its dynamic redistribution during immunological synapse formation. *Mol. Cell Biol.* 23, 8042-8057.

Banner, K.H., Trevethick, M.A., 2004. PDE4 inhibition: a novel approach for the treatment of inflammatory bowel disease. *Trends in Pharmacological Sciences* 25, 430-436.

Bender, A.T., Beavo, J.A., 2006. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Molecular regulation to clinical use. *Pharmacological Reviews* 58, 488-520.

Boswell-Smith, V., Spina, D., Page, C.P., 2006. Phosphodiesterase inhibitors. *British Journal of Pharmacology* 147, S252-S257.

Breder, C.D., Hazuka, C., Ghayur, T., Klug, C., Huginin, M., Yasuda, K., Teng, M., Saper, C.B., 1994. Regional Induction of Tumor-Necrosis-Factor Alpha Expression in the Mouse-Brain After Systemic Lipopolysaccharide Administration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 11393-11397.

Breder, C.D., Saper, C.B., 1996. Expression of inducible cyclooxygenase mRNA in the mouse brain after systemic administration of bacterial lipopolysaccharide. *Brain Research* 713, 64-69.

Buljevac, D., Flach, H.Z., Hop, W.C., Hijdra, D., Laman, J.D., Savelkoul, H.F., Der Meche, F.G., van Doorn, P.A., Hintzen, R.Q., 2002. Prospective study on the relationship between infections and multiple sclerosis exacerbations. *Brain* 125, 952-960.

Cai, Z., Pang, Y., Lin, S., Rhodes, P.G., 2003. Differential roles of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta in lipopolysaccharide-induced brain injury in the neonatal rat. *Brain Res.* 975, 37-47.

Cherry, J.A., Davis, R.L., 1999. Cyclic AMP phosphodiesterases are localized in regions of the mouse brain associated with reinforcement, movement, and affect. *J. Comp Neurol.* 407, 287-301.

Conti, M., 2000. Phosphodiesterases and cyclic nucleotide signaling in endocrine cells. *Mol. Endocrinol.* 14, 1317-1327.

Conti, M., Beavo, J., 2007. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide Phosphodiesterases: Essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annual Review of Biochemistry* 76, 481-511.

D'Sa, C., Tolbert, L.M., Conti, M., Duman, R.S., 2002. Regulation of cAMP-specific phosphodiesterases type 4B and 4D (PDE4) splice variants by cAMP signaling in primary cortical neurons. *J. Neurochem.* 81, 745-757.

D'Souza, S.D., Alinauskas, K.A., Antel, J.P., 1996. Ciliary neurotrophic factor selectively protects human oligodendrocytes from tumor necrosis factor-mediated injury. *J. Neurosci. Res.* 43, 289-298.

Elmqvist, J.K., Breder, C.D., Sherin, J.E., Scammell, T.E., Hickey, W.F., Dewitt, D., Saper, C.B., 1997. Intravenous lipopolysaccharide induces cyclooxygenase 2-like immunoreactivity in rat brain perivascular microglia and meningeal macrophages. *Journal of Comparative Neurology* 381, 119-129.

Franklin K. B. J. and Paxinos G. 2007. *The Mouse Brain in stereotaxic coordinates*, Academic Press.

Goppelt-Struebe, M., 1995. Regulation of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozyme expression. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 52, 213-222.

Graeber, M.B., Streit, W.J., 1990. Perivascular microglia defined. *Trends Neurosci.* 13, 366.

Hart, B.L., 1988. Biological basis of the behavior of sick animals. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 12, 123-137.



- Hebenstreit, G.F., Fellerer, K., Fichte, K., Fischer, G., Geyer, N., Meya, U., Hernandez, M., Schony, W., Schratzer, M., Soukop, W., 1989. Rolipram in major depressive disorder: results of a double-blind comparative study with imipramine. *Pharmacopsychiatry* 22, 156-160.
- Houslay, M.D., 1998. Adaptation in cyclic AMP signalling processes: a central role for cyclic AMP phosphodiesterases. *Semin. Cell Dev. Biol.* 9, 161-167.
- Houslay, M.D., Adams, D.R., 2003. PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochemical Journal* 370, 1-18.
- Huston, E., Lumb, S., Russell, A., Catterall, C., Ross, A.H., Steele, M.R., Bolger, G.B., Perry, M.J., Owens, R.J., Houslay, M.D., 1997. Molecular cloning and transient expression in COS7 cells of a novel human PDE4B cAMP-specific phosphodiesterase, HSPDE4B3. *Biochem. J.* 328 ( Pt 2), 549-558.
- Jin, S.L., Lan, L., Zoudilova, M., Conti, M., 2005. Specific role of phosphodiesterase 4B in lipopolysaccharide-induced signaling in mouse macrophages. *J. Immunol.* 175, 1523-1531.
- Jin, S.L., Conti, M., 2002. Induction of the cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE4B is essential for LPS-activated TNF-alpha responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 7628-7633.
- Johnson, A.K., Gross, P.M., 1993. Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. *FASEB J.* 7, 678-686.
- Khan, N.A., Khan, A., Savelkoul, H.F., Benner, R., 2002. Inhibition of septic shock in mice by an oligopeptide from the beta-chain of human chorionic gonadotrophin hormone. *Hum. Immunol.* 63, 1-7.
- Kloss, C.U., Bohatschek, M., Kreutzberg, G.W., Raivich, G., 2001. Effect of lipopolysaccharide on the morphology and integrin immunoreactivity of ramified microglia in the mouse brain and in cell culture. *Exp. Neurol.* 168, 32-46.
- Konsman, J.P., Parnet, P., Dantzer, R., 2002. Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. *Trends Neurosci.* 25, 154-159.
- Laflamme, N., Lacroix, S., Rivest, S., 1999. An essential role of interleukin-1beta in mediating NF-kappaB activity and COX-2 transcription in cells of the blood-brain barrier in response to a systemic and localized inflammation but not during endotoxemia. *J. Neurosci.* 19, 10923-10930.
- Lambertsen, K.L., Clausen, B.H., Babcock, A.A., Gregersen, R., Fenger, C., Nielsen, H.H., Haugaard, L.S., Wrenfeldt, M., Nielsen, M., Dagnaes-Hansen, F., Bluethmann, H., Faergeman, N.J., Meldgaard, M., Deierborg, T., Finsen, B., 2009. Microglia protect neurons against ischemia by synthesis of tumor necrosis factor. *J. Neurosci.* 29, 1319-1330.
- Landry, M., Holmberg, K., Zhang, X., Hokfelt, T., 2000. Effect of axotomy on expression of NPY, galanin, and NPY Y1 and Y2 receptors in dorsal root ganglia and the superior cervical ganglion studied with double-labeling in situ hybridization and immunohistochemistry. *Exp. Neurol.* 162, 361-384.
- Liberto, C.M., Albrecht, P.J., Herx, L.M., Yong, V.W., Levison, S.W., 2004. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J. Neurochem.* 89, 1092-1100.
- Miró X, Perez-Torres, S., Puigdomenech, P., Palacios, J.M., Mengod, G., 2002. Differential distribution of PDE4D splice variant mRNAs in rat brain suggests association with specific pathways and presynaptic localization. *Synapse* 45, 259-269.
- Miró, X., Perez-Torres, S., Palacios, J.M., Puigdomenech, P., Mengod, G., 2001. Differential distribution of cAMP-specific phosphodiesterase 7A mRNA in rat brain and peripheral organs. *Synapse* 40, 201-214.
- Mori, F., Perez-Torres, S., De Caro, R., Porzionato, A., Macchi, V., Beleta, J., Gavalda, A., Palacios, J.M., Mengod, G., 2010. The human area postrema and other nuclei related to the emetic reflex express cAMP phosphodiesterases 4B and 4D. *J. Chem. Neuroanat.* 40, 36-42.
- Oger, S., Mehats, C., Dallot, E., Ferre, F., Leroy, M.J., 2002. Interleukin-1beta induces phosphodiesterase 4B2 expression in human myometrial cells through a prostaglandin E2- and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent pathway. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 87, 5524-5531.
- Park, J.H., Shin, S.H., 1996. Induction of IL-12 gene expression in the brain in septic shock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224, 391-396.
- Pérez-Torres, S., Miró X, Palacios, J.M., Cortés, R., Puigdoménech, P., Mengod, G., 2000. Phosphodiesterase type 4 isozymes expression in human brain examined by in situ hybridization histochemistry and [3H]rolipram binding autoradiography. Comparison with monkey and rat brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 20, 349-374.
- Pompeiano, M., Palacios, J.M., Mengod, G., 1992. Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT1A receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. *J. Neurosci.* 12, 440-453.
- Quan, N., Whiteside, M., Herkenham, M., 1998a. Cyclooxygenase 2 mRNA expression in rat brain after peripheral injection of lipopolysaccharide. *Brain Res.* 802, 189-197.
- Quan, N., Whiteside, M., Herkenham, M., 1998b. Time course and localization patterns of interleukin-1beta messenger RNA expression in

- brain and pituitary after peripheral administration of lipopolysaccharide. *Neuroscience* 83, 281-293.
- Reyes-Irisarri, E., Perez-Torres, S., Mengod, G., 2005. Neuronal expression of cAMP-specific phosphodiesterase 7b mRNA in the rat brain. *Neuroscience* 132, 1173-1185.
- Reyes-Irisarri, E., Perez-Torres, S., Miro, X., Martinez, E., Puigdomenech, P., Palacios, J.M., Mengod, G., 2008. Differential distribution of PDE4B splice variant mRNAs in rat brain and the effects of systemic administration of LPS in their expression. *Synapse* 62, 74-79.
- Reyes-Irisarri, E., Sanchez, A.J., Garcia-Merino, J.A., Mengod, G., 2007. Selective induction of cAMP phosphodiesterase PDE4B2 expression in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuropathology and Experimental Neurology* 66, 923-931.
- Schiltz, J.C., Sawchenko, P.E., 2002. Distinct brain vascular cell types manifest inducible cyclooxygenase expression as a function of the strength and nature of immune insults. *J. Neurosci.* 22, 5606-5618.
- Schmitz, G.G., Walter, T., Seibl, R., Kessler, C., 1991. Nonradioactive labeling of oligonucleotides in vitro with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase. *Anal. Biochem.* 192, 222-231.
- Semmler, A., Okulla, T., Sastre, M., Dumitrescu-Ozimek, L., Heneka, M.T., 2005. Systemic inflammation induces apoptosis with variable vulnerability of different brain regions. *J. Chem. Neuroanat.* 30, 144-157.
- Serrats, J., Artigas, F., Mengod, G., Cortes, R., 2003. GABAB receptor mRNA in the raphe nuclei: co-expression with serotonin transporter and glutamic acid decarboxylase. *J. Neurochem.* 84, 743-752.
- Sly, L.M., Krzesicki, R.F., Brashler, J.R., Buhl, A.E., McKinley, D.D., Carter, D.B., Chin, J.E., 2001. Endogenous brain cytokine mRNA and inflammatory responses to lipopolysaccharide are elevated in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res. Bull.* 56, 581-588.
- Swinnen, J.V., Joseph, D.R., Conti, M., 1989. The mRNA encoding a high-affinity cAMP phosphodiesterase is regulated by hormones and cAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86, 8197-8201.
- Takahashi, M., Terwilliger, R., Lane, C., Mezes, P.S., Conti, M., Duman, R.S., 1999. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP-specific phosphodiesterase 4A and 4B isoforms. *J. Neurosci.* 19, 610-618.
- Tomiyama, M., Palacios, J.M., Cortes, R., Vilaro, M.T., Mengod, G., 1997. Distribution of AMPA receptor subunit mRNAs in the human basal ganglia: an in situ hybridization study. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 46, 281-289.
- Torphy, T.J., 1998. Phosphodiesterase isozymes - Molecular targets for novel antiasthma agents. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 157, 351-370.
- Villa, P., Ghezzi, P., 2004. Animal models of endotoxic shock. *Methods Mol. Med.* 98, 199-206.
- Yamamoto, S., Sugahara, S., Ikeda, K., Shimizu, Y., 2006. Pharmacological profile of a novel phosphodiesterase 7A and-4 dual inhibitor, YM-393059, on acute and chronic inflammation models. *European Journal of Pharmacology* 550, 166-172.

# Neuroanatomical distribution and neurochemical characterization of cells expressing adenylyl cyclase isoforms in mouse and rat brain

Cristina Sanabra and Guadalupe Mengod

Departament de Neuroquímica i Neurofarmacologia, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (CSIC), IDIBAPS, CIBERNED, 08036 Barcelona, Spain.

**Keywords:** *In situ* hybridization, cAMP, adenylyl cyclase, glutamatergic cells, cholinergic cells, GABAergic cells

Publicat a *Journal of Chemical Neuroanatomy*



Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Chemical Neuroanatomy

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jchemneu](http://www.elsevier.com/locate/jchemneu)

## Neuroanatomical distribution and neurochemical characterization of cells expressing adenylyl cyclase isoforms in mouse and rat brain

Cristina Sanabra, Guadalupe Mengod\*

Departament de Neuroquímica i Neurofarmacologia, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, CSIC, IDIBAPS, CIBERNED, 08036 Barcelona, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 8 September 2010

Received in revised form 2 November 2010

Accepted 3 November 2010

Available online 19 November 2010

## Keywords:

*In situ* hybridization

cAMP

Adenylyl cyclase

Cholinergic cells

Glutamatergic cells

GABAergic cells

## ABSTRACT

Transmembrane adenylyl cyclases (Adcy) are involved in the regulation of multiple brain processes such as synaptic plasticity, learning and memory. They synthesize intracellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP) following activation by G-protein coupled receptors. We examined the neuroanatomical distribution of the nine Adcy isoforms in rat and mouse brain by *in situ* hybridization, as well as their location in glutamatergic, GABAergic and cholinergic neurons in several mouse brain areas by double *in situ* hybridization. The Adcys are widely distributed throughout the brain in both rat and mouse, being especially abundant in cortex, hippocampus, thalamic nuclei, the olfactory system and the granular layer of the cerebellum. Double-labeling experiments showed that Adcy isoforms are differently expressed in glutamatergic, GABAergic and cholinergic neuronal cell populations. We report the neuroanatomical distribution of the nine known Adcy isoforms in rat and mouse brain and their cellular localization.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

cAMP has a key role as an intracellular messenger, mediating the effects of extracellular signals in various tissues. In brain, cAMP is involved in sensory functions, synaptic plasticity, learning and memory. Intracellular levels of cAMP are controlled by its synthesis, catalyzed by the enzyme adenylyl cyclase, and by its degradation through the action of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs).

There are currently ten identified isoforms of the adenylyl cyclase (Adcy) enzymes: transmembrane Adcys 1–9 regulated by a host of hormones, neurotransmitters and other regulatory molecules through interaction with G protein-coupled receptors, playing an important role in neurotransmission in the CNS (Adcy 1–9) and soluble Adcy regulated by bicarbonate. Increased levels of cAMP in different signaling pathways regulate neuronal mechanisms like synaptic plasticity, learning and memory, and neuroinflammatory responses. Transmembrane Adcy mRNAs are widely expressed throughout the brain, especially in olfactory bulb, hippocampus and cerebellum (Matsuoka et al., 1992; Visel et al., 2006) and present in other peripheral organs (Defer et al., 2000; Risoe et al., 2007). The role of some Adcy isoforms in a number of brain processes, such as Adcy1 and Adcy8 in learning and memory (Mons et al., 1999; Conti

et al., 2007), and Adcy5 in dopamine receptor signaling in the striatum (Lee et al., 2002) are broadly understood, but little is known about the function of other Adcys in the CNS. To date, nine Adcy isoforms have been cloned and identified in various tissues (Hanoune and Defer, 2001). Adcy isoforms are classified, according to their protein sequence homologies and function, into four groups (Patel et al., 2001; Cooper, 2005), designated as A, B, C and D (Visel et al., 2006). Group A consists of Adcy1, Adcy3 and Adcy8, which are stimulated by  $Ca^{+2}/CaM$  (Cali et al., 1994; Krupinski and Cali, 1998). Adcy1 and Adcy8 are expressed in neuronal tissue (Wong et al., 1999), while Adcy3 is mostly expressed in the olfactory system (Bishop et al., 2007). Adcy2, Adcy4 and Adcy7, forming group B, are  $Ca^{+2}$ -insensitive but are stimulated by the  $G_{\beta\gamma}$  subunit (Feinstein et al., 1991). Adcy4 and Adcy7 are widely distributed in several tissues (Mons et al., 1998a,b), while Adcy2 is mainly found in lung and brain. Group C contains Adcy5 and Adcy6, expressed mostly in heart and brain, and inhibited by  $Ca^{+2}$  and the  $G_{i\alpha}$  subunit (Defer et al., 2000). Adcy9, expressed mainly in brain, belongs to group D and is the only isoform that is not activated by forskolin, although it is responsive to calcineurin (Premont et al., 1996). The uneven tissue distribution of the individual Adcy isoforms and the diversity of their regulatory features may reflect a specific function of this effector molecule in determining the routing of signals to the cAMP pathway.

Knowledge of the cell location of the Adcys in brain is an important step towards understanding their function. Here, we analyze the regional expression of mRNA coding for the different Adcy isoforms in adult rat and mouse brain. By *in situ* hybridization, we determined in different rat and mouse brain areas the location of

\* Corresponding author at: Department of Neurochemistry and Neuropharmacology, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, CSIC, Rosselló, 161, 08036 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 363 8323; fax: +34 93 363 8301.

E-mail address: [gmlnqr@ibb.csic.es](mailto:gmlnqr@ibb.csic.es) (G. Mengod).



mRNA coding for nine different Adcys and the type of neuron in which they are expressed. Our study revealed that each Adcy mRNA has a distinct distribution, with differences between species.

**2. Experimental procedures**

**2.1. Tissue preparation**

Male Wistar rats (n = 5) (200–300 g) were purchased from Iffa Credo (Lyon, France) and adult male C57BL6 mice (n = 5) (15–20 g) from Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA). Animal care followed the Spanish legislation on “Protection of animals used in experimental and other scientific purposes”, which is in line with the European (E.E.C) regulations (O.J. of E.C. L358/1 18/12/1986). Rats were killed by decapitation and mice by cervical dislocation. The brains were rapidly removed, frozen on dry ice and kept at –20 °C. Tissue sections, 14 µm thick, were cut on a microtome-cryostat (Microm HM550 OM, Walldorf, Germany), thaw-mounted on APTS (3-aminopropyltriethoxysilane; Sigma, St. Louis, MO, USA)-coated slides, and kept at –20 °C until used.

**2.2. Hybridization probes**

The 45 base-oligodeoxyribonucleotides used for the detection of Adcy mRNAs are listed in Table 1. These regions were chosen because they share no similarity with the other Adcy isoforms.

Glutamatergic cells were recognized by the presence of the mRNA coding for both vesicular glutamate transporters (vGluT1 and vGluT2): vGluT1 with two oligonucleotides complementary to bases 127–172 and 1756–1800 (GenBank acc. no U07609) and vGluT2 with two oligonucleotides complementary to bases 466–510 and 2156–2200 (GenBank acc. no AF271235). GABAergic cells were identified by the presence of the enzyme synthesizing GABA, glutamic acid decarboxylase (GAD), which is found in adult brain as two major isoforms: GAD65 and GAD67. Two oligonucleotides for each isoform mRNA were made: bp 159–213 and 514–558 (GenBank acc. no NM 012563) and bp 191–235 and 1600–1653 (GenBank acc. no NM 017007). Cholinergic cells were distinguished by the presence of choline acetyltransferase (ChAT) mRNA with two oligonucleotides complementary to bases 571–618 and 1321–1368 of the rat ChAT cDNA sequence (Ishii et al., 1990).

The oligonucleotides were all synthesized and HPLC purified by Isogen Bioscience BV (Maarsen, The Netherlands). Evaluation of the oligonucleotide sequences with the basic local alignment search tool (BLAST) of EMBL and GenBank databases indicated that the probes show no significant similarity with mRNAs other than their corresponding targets in rat and mouse.

Oligonucleotides for Adcy mRNAs were labeled at their 3'-end by [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]dATP (3000 Ci/mmol, New England Nuclear, Boston, MA, USA) for the *in situ* hybridization histochemistry experiments and terminal deoxynucleotidyltransferase (TdT, Oncogene Research Products, San Diego, CA, USA), purified with the QIAquick Nucleotide Removal Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) (Tomiyama et al., 1997). For the colocalization studies vGluT, GAD and ChAT oligonucleotides were labeled

with Dig-11-dUTP and TdT (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to a previously described procedure (Schmitz et al., 1991).

**2.3. In situ hybridization histochemistry procedure**

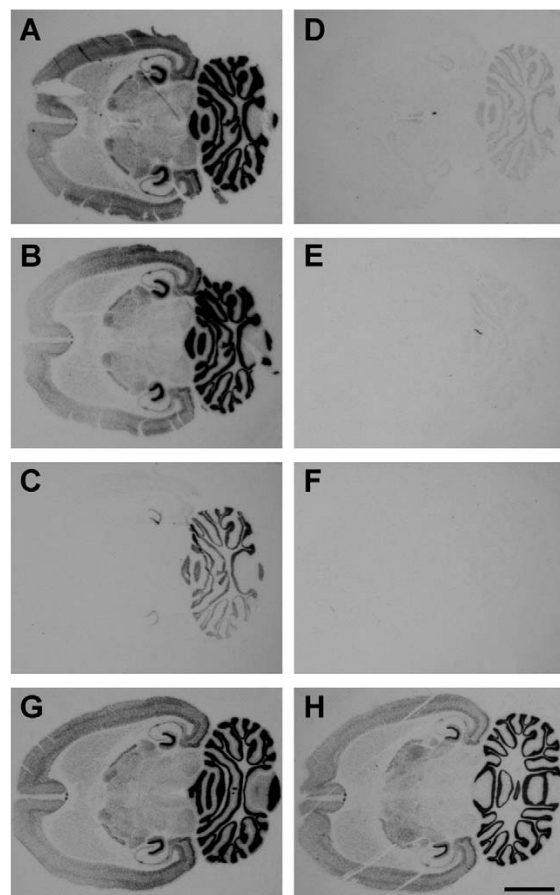
The protocols for single- and double-label *in situ* hybridization histochemistry were based on previously described procedures (Tomiyama et al., 1997; Landry et al., 2000) and have been already published (Serrats et al., 2003). Frozen tissue sections were brought to room temperature, fixed for 20 min at 4 °C in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS; 1× PBS: 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 136 mM NaCl, 2.6 mM KCl), washed for 5 min in 3× PBS at room temperature, twice for 5 min each in 1× PBS, and incubated for 2 min at 21 °C in a solution of predigested pronase (Calbiochem, San Diego, CA, USA) at a final concentration of 24 U/ml in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA.

Enzyme activity was stopped by immersion for 30 s in 2 mg/ml glycine in 1× PBS. Tissues were finally rinsed in 1× PBS and dehydrated through a graded series of ethanol. For hybridization, radioactively and non-radioactively labeled probes were diluted in a solution containing 50% formamide, 4× SSC (1× SSC: 150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate), 1× Denhardt's solution (0.02% Ficoll, 0.02% polyvinylpyrrolidone, 0.02% bovine serum albumin), 10% dextran sulfate, 1% sarkosyl, 20 mM phosphate buffer pH 7.0, 250 µg/ml yeast tRNA and 500 µg/ml salmon sperm DNA. The final concentrations of radioactive and digoxigenin-labeled probes in the hybridization buffer were in the same range (approximately 1.5 nM). Tissue sections were covered with hybridization solution containing the labeled probe/s, overlaid with Nescofilm coverslips (Bando Chemical Inc., Kobe, Japan) and incubated overnight at 42 °C in humid boxes. Sections were washed four times

**Table 1**  
List of oligonucleotides used.

mRNA	Oligonucleotide name	Accession number	Bp limits
Adcy 1	rAC1/2	XM 223616	3555–3599
	rAC1/3	XM 223616	3612–3656
Adcy 2	rAC2/1	NM 031007	2908–2952
	rAC2/2	NM 031007	2975–3019
	rAC2/3	NM 031007	2957–3001
Adcy 3	rAC3/1	NM 130779	2751–2795
	rAC3/2	NM 130779	2533–2577
Adcy 4	rAC4/1	NM 019285	2406–2450
	rAC4/2	NM 019285	3257–3301
	rAC4/3	NM 019285	2611–2655
	rAC4/4	NM 019285	2866–2910
	rAC4/5	NM 019285	112–156
	rAC4/6	NM 019285	1417–1461
Adcy 5	rAC5/1	NM 022600	3061–3105
	rAC5/2	NM 022600	1340–1384
Adcy 6	rAC6/2	NM 012821	656–700
	rAC6/3	NM 012821	601–645
	rAC6/4	NM 012821	500–544
Adcy 7	rAC7/1	XM 226333	3760–3804
	rAC7/3	XM 226333	3809–3853
	rAC7/4	XM 226333	3710–3754
Adcy 8	rAC8/1	NM 017142	3961–4005
	rAC8/2	NM 017142	4109–4153
Adcy 9	rAC9/1	XM 220178	2786–2830
	rAC9/2	XM 220178	2945–2990

Adcy, adenylate cyclase.



**Fig. 1.** Specificity controls of the hybridization signal obtained with two labeled oligonucleotides. Rat horizontal sections were hybridized with <sup>33</sup>P-labeled oligonucleotide rAC1/2 (A–G) or rAC1/3 (H). Thermal stability of the hybrids was examined by washing at 50 °C (A), 60 °C (B) and 80 °C (C). No hybridization signal remained after co-hybridizing each labeled oligonucleotide with an excess of the corresponding unlabeled oligonucleotide (rAC1/2): 100× (D), 500× (E) and 1000× (F). The same hybridization pattern is observed for the two oligonucleotide probes used in G and H. Scale bar = 400 µm.

(15 min each) in 0.6 M NaCl, 10 mM Tris–HCl pH 7.5 at 60 °C, and once in the same buffer at room temperature for 30 min.

2.4. Development of radioactive and non-radioactive hybridization signals

Hybridized sections were treated as described by Landry et al. (2000). Briefly, after washing, the slides were immersed for 30 min in a buffer containing 0.1 M Tris–HCl pH 7.5, 1 M NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.5% bovine serum albumin (Sigma, Steinheim, Germany) and incubated overnight at 4 °C in the same solution with alkaline-phosphatase-conjugated anti-digoxigenin-F(ab) fragments (1:5000; Roche Diagnostics GmbH). Then, they were washed three times (10 min each) in the same buffer (without antibody) and washed twice in an alkaline buffer containing 0.1 M Tris–HCl pH 9.5, 0.1 M NaCl, and 5 mM MgCl<sub>2</sub>. Alkaline phosphatase activity was developed by incubating the sections with 3.3 mg nitroblue tetrazolium and 1.65 mg bromochloroindolyl phosphate (Roche Diagnostics GmbH) diluted in 10 ml of alkaline buffer. The enzyme reaction was blocked by extensive rinsing in the alkaline buffer containing 1 mM EDTA. The sections were then briefly dipped in 70% and 100% ethanol, air-dried and dipped in Ilford K5 nuclear emulsion (Ilford, Moberly, Cheshire, UK) diluted 1:1 with distilled water. They were exposed in the dark at 4 °C for 6 weeks, and finally developed in Kodak D19 (Kodak, Rochester, NY, USA) for 5 min and fixed in Ilford Hypam fixer (Ilford). For film autoradiography, some hybridized sections were exposed to Biomax-MR (Kodak) films for 2–4 weeks at –70 °C with intensifying screens. Consecutive sections were stained with Cresyl Violet for anatomical reference.

2.5. Analysis of the results

Tissue sections were examined and cells quantified with an Olympus BX51 Stereo Microscope (Olympus, Tokyo, Japan) equipped with bright- and dark-field condensers for transmitted light. Cells were counted manually through the microscope with the help of Visiopharm Integrator System (Visiopharm Software, Hørsholm, Denmark). In this software a meander sampling tool was used to pass by

the same counting areas twice, to be able to first count the amount of DIG-positive labeled cells in a predetermined area and then distinguish which of the cells also show silver grain accumulation.

Glutamatergic, GABAergic and cholinergic neurons were identified as cellular profiles exhibiting a dark precipitate (alkaline phosphatase reaction product) surrounding or covering the nucleus. The Adcy hybridization signal was considered positive when accumulation of silver grains over the stained cellular profiles was greater than three times that of the background.

2.6. Preparation on figures

Hybridized tissue section images from film autoradiograms were digitalized by a Wild 420 macroscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with a digital camera (DXM1200 F, Nikon) and ACT-1 Nikon software. Microphotography was performed with an Olympus BX51 Stereo Microscope (Olympus, Tokyo, Japan) equipped with a digital camera (DXM1200 F, Nikon). Figures were prepared for publication with Adobe Photoshop software (Adobe Software, San Jose, CA, USA). Contrast and brightness of images were the only variables we adjusted digitally. For anatomical reference, sections close to those used were stained with cresyl violet.

3. Results

3.1. Controls for specificity of the probes

The specificity of the autoradiographic signal obtained in the *in situ* hybridization histochemistry experiments was confirmed by a series of routine controls (Pompeiano et al., 1992). For each mRNA under study, at least two different oligonucleotide probes complementary to different regions of the same mRNA were used

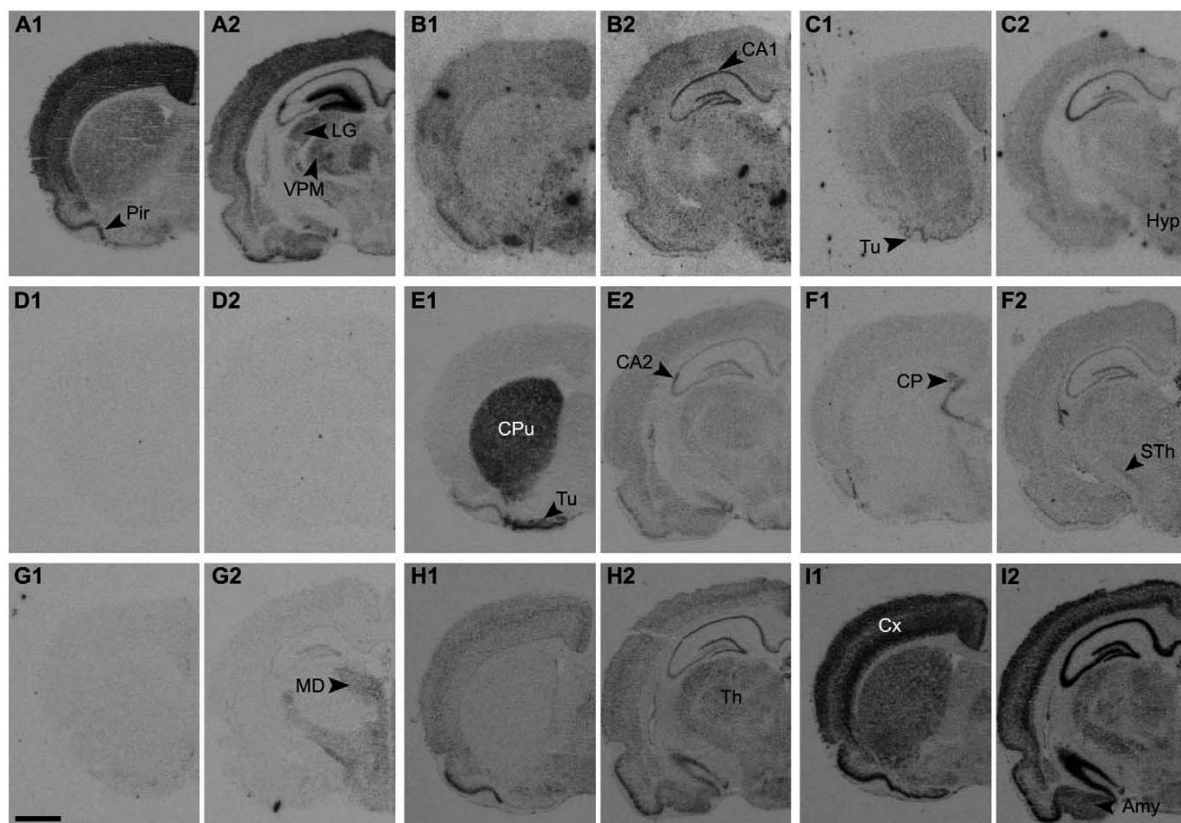


Fig. 2. Expression of adenylyl cyclase mRNA in rat brain. Macroscopic photographs of autoradiographic film images of coronal sections showing mRNA hybridization pattern of nine isoforms of adenylyl cyclases in Wistar rats. A1, A2 Adcy1 mRNA, B1, B2 Adcy2 mRNA, C1, C2 Adcy3 mRNA, D1, D2 Adcy4 mRNA, E1, E2 Adcy5 mRNA, F1, F2 Adcy6 mRNA, G1, G2 Adcy7 mRNA, H1, H2 Adcy 8 mRNA, I1, I2 Adcy9 mRNA. Amy, amygdala; CA, Cornu Ammonis; CP, choroid plexus; CPu, caudate-putamen; Cx, cortex; Hyp, hypothalamus; LG, lateral geniculate nucleus; MD, medial dorsal thalamic nucleus; Pir, piriform cortex; STh, subthalamic nucleus; Th, thalamus; Tu, olfactory tubercle; VPM, ventral posteromedial thalamic nucleus. Scale bar = 2 mm.



independently as hybridization probes in consecutive sections of the same animal showing identical patterns of hybridization (Fig. 1G and H). For a given oligonucleotide probe, addition in the hybridization solution of an excess of the same unlabeled oligonucleotide resulted in the complete abolition of the specific hybridization signal. The remaining autoradiographic signal was considered background (Fig. 1D, E, and F). If the unlabeled oligonucleotide included in the hybridization was a different oligonucleotide, then the hybridization signal was not affected. The thermal stability of the hybrids was examined by washing at increasing temperatures: a sharp decrease in the hybridization signal was observed at a temperature consistent with the  $T_m$  of the hybrids (Fig. 1A, B, and C).

*In situ* hybridization histochemistry provides reliable information concerning the relative abundance of a given mRNA species in different regions. However, caution must be taken in comparing the relative hybridization signals produced by different probes that detect different mRNAs. In addition to the actual abundance of the different mRNAs, the intensity of the hybridization signals observed, which is the parameter used in the present series of experiments for comparison between mRNAs, can be affected by other factors, such as differences in the hybridization efficiency of the various probes or differences in the specific activities of the labeled probes. Therefore, the results given here have to be interpreted with this caveat in mind when the abundance of the mRNA coding for the different Adcy enzymes is being compared.

3.2. Adcy mRNA distribution in rat and mouse brain

The distribution by *in situ* hybridization histochemistry of the different Adcy mRNA transcripts at coronal levels of the rat and mouse brain, illustrated in Figs. 2 and 3 and Tables 2 and 3, showed a selective expression pattern in certain cell layers and nuclei of the brain. Labeled brain nuclei were identified by comparison of the film autoradiograms with cresyl violet staining of the hybridized tissues. Adcy4 mRNA (Figs. 2 and 3) could not be detected in any area of mouse or rat brain and will not be described below.

3.2.1. Cortex

The expression pattern for all Adcy mRNAs was similar in both species.

A clearly different expression pattern in layers of the cortex was observed for transcripts of Adcy1, Adcy2, Adcy3, Adcy8 and Adcy9 in both rat (Fig. 2) and mouse (Fig. 3) brain. We also detected a homogeneous hybridization signal in all cortical cell layers for Adcy5 and Adcy6 and very low for Adcy7 mRNAs.

3.2.2. Olfactory system

Olfactory tubercle and piriform cortex were the two brain regions of the olfactory system that we examined in coronal sections of rodent brain in this work (see Tables 2 and 3). The mRNA levels of Adcy5 and Adcy9 isozymes were very high and moderate, respectively, in both rat and mouse (Figs. 2E1, 2I1 and 3E1, 3I1). We also observed a very low hybridization signal for

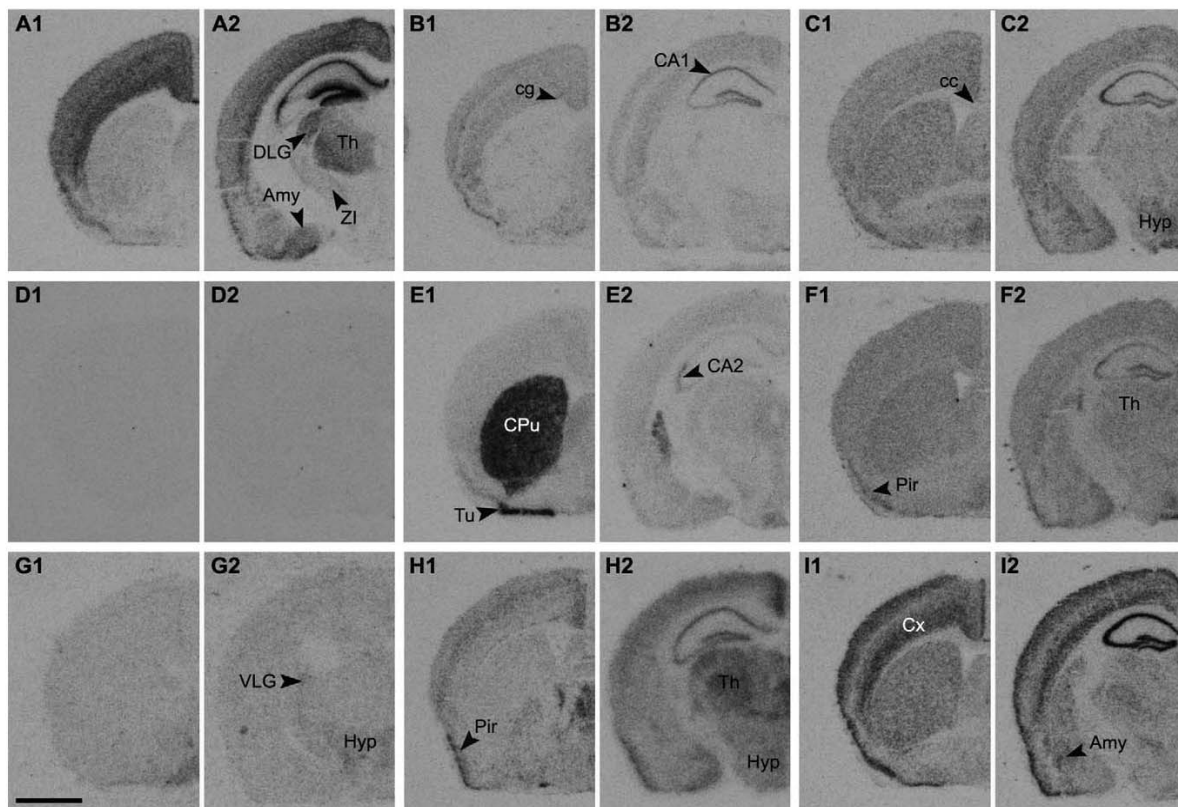


Fig. 3. Expression of adenylyl cyclase mRNA in mouse brain. Macroscopic photographs of autoradiographic film images of coronal sections showing mRNA hybridization pattern of nine isoforms of adenylyl cyclases in C57BL6 mice. A1, A2 Adcy1 mRNA, B1, B2 Adcy2 mRNA, C1, C2 Adcy3 mRNA, D1, D2 Adcy4 mRNA, E1, E2 Adcy5 mRNA, F1, F2 Adcy6 mRNA, G1, G2 Adcy7 mRNA, H1, H2 Adcy8 mRNA, I1, I2 Adcy9 mRNA. Amy, amygdala; CA, *Cornu Ammonis*; cg, cingulum; CPu, caudate-putamen; Cx, cortex; DLG, dorsolateral geniculate nucleus; Hyp, hypothalamus; Pir, piriform cortex; Th, thalamus; Tu, olfactory tubercle; VLG, ventrolateral geniculate nucleus; ZI, zona incerta. Scale bar = 2 mm.

**Table 2**  
Expression of mRNAs encoding Adcy isoforms in different regions of rat brain.

Brain area	Adcy 1	Adcy 2	Adcy 3	Adcy 4	Adcy 5	Adcy 6	Adcy 7	Adcy 8	Adcy 9
Cerebral cortex	++	++	+ / ++	–	+	+	+ / –	+ / –	+ / + + +
Olfactory system									
Olfactory tubercle	+ / –	+ / –	+	–	+++	+ / –	–	–	++
Piriform cortex	+++	++ / + + +	+	–	++	++ / + + +	–	+++	+++
Basal ganglia and related areas									
Corpus callosum	–	+ / ++	–	–	+ / –	+ / –	–	+ / –	+
Caudate-Putamen	+	+ / –	++	–	+++	–	–	–	++
Amygdala	++	++	++	–	++	++	–	+	+ / ++
Limbic areas									
Ammon's horn									
CA1 (pyramidal cell layer)	+	+++	++	–	+	+	+	++	+++
CA2 (pyramidal cell layer)	+++	+	+++	–	++	+ / ++	+	+	+++
CA3 (pyramidal cell layer)	++	+	+++	–	+	+	+	+	+++
Dentate gyrus	+++	+++	++	–	++	++ / + + +	++	+	+++
Thalamus and hypothalamus									
Med/Lat habenular nucleus	+	+ / –	–	–	++	++	+++	++	++
Thalamic nucleus group	++	+ / –	+	–	+	++	–	+ / + + +	+ / + + +
Reticular thalamic nucleus	++ / + + +	+	+	–	+	++	++	+	+
Medial hypothalamic nucleus	+	+	+	–	++	++	++ / + + +	+ / –	+ / –
Lateral geniculate nucleus	++ / + + +	+	+	–	++	++	++	+	+
Brainstem									
Superior colliculus	+	+	+	–	+	+	+	+	+
Inferior colliculus	+	+ / –	+	–	+	+	+	+	+
Cerebellum	+++	++	++	–	+	+++	+ / + + +	+++	++ / + + +
Circumventricular organs									
Choroid plexus	–	–	–	–	–	+++	+ / –	++	–

Relative expression is indicated as follows: + + +, very high; + + / + + +, high; ++, moderate; + / + +, low moderate; +, low; + / –, very low or hard to detect; –, not expressed. Adcy, adenylylate cyclase.

Adcy7 in the mouse brain sections. In the case of the piriform cortex, we detected the expression of transcripts of all Adcy genes (Figs. 2 and 3) except Adcy7 and Adcy3, which had a very low hybridization signal.

### 3.2.3. Striatum

The striatum nucleus is the main expression site of Adcy5 mRNA in both species (Figs. 2 and 3E1 and E1). We also found a strong and moderate hybridization signal in this brain nucleus for Adcy3 (Figs. 2C1 and 3C1) and Adcy9 (Figs. 2I1 and 3I1) transcripts,

respectively. In rat brain, Adcy1 mRNA was expressed at moderate levels in the striatum (Fig. 2A1), whereas in mouse the transcript was present but at lower levels (Fig. 3A1). In the case of Adcy6 mRNA, the hybridization signal in striatum was moderate in coronal sections of mouse brain (Fig. 3F1), but we did not detect it in rat sections (Fig. 2F1).

### 3.2.4. Amygdala

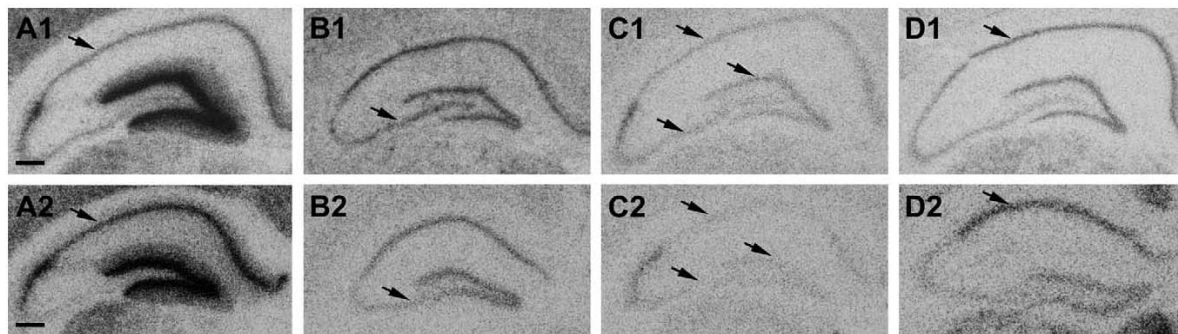
We found moderate levels of mRNA expression in both species for all Adcy isozymes except Adcy9, which had a strong

**Table 3**  
Expression of mRNAs encoding Adcy isoforms in different regions of mouse brain.

Brain area	Adcy 1	Adcy 2	Adcy 3	Adcy 4	Adcy 5	Adcy 6	Adcy 7	Adcy 8	Adcy 9
Cortex	++	++	++	–	+	++	+ / –	++	++ / + + +
Olfactory system									
Olfactory tubercle	+	–	+ / + +	–	+++	++	+	+ / –	++ / + + +
Piriform cortex	++	++ / + + +	++	–	+ / + +	+++	+ / –	+++	+++
Basal ganglia and related areas									
Corpus callosum	–	+ / –	+	–	–	+ / + +	+ / –	++	+
Caudate-Putamen	+ / –	+ / –	++	–	+++	–	–	+ / –	++
Amygdala	++	+	++	–	+	++ / + + +	+ / –	+	+ / ++
Limbic areas									
Ammon's horn									
CA1 (pyramidal cell layer)	++ / + + +	+++	+++	–	+ / –	++ / + + +	–	++ / + + +	+++
CA2 (pyramidal cell layer)	+++	++	+++	–	++	+++	–	++	+++
CA3 (pyramidal cell layer)	+ / –	++	+++	–	+ / –	++ / + + +	–	++ / + + +	+++
Dentate gyrus	+++	+++	++ / + + +	–	+ / –	+++	–	++ / + + +	+++
Thalamus and hypothalamus									
Med/Lat habenular nucleus	+ / –	++	++	–	++	++	++	++ / + + +	+
Thalamic nucleus group	++	+ / –	+	–	+	++	–	+++	++
Reticular thalamic nucleus	++ / + + +	++	+ / + +	–	+	++	++	+ / + + +	+
Medial hypothalamic nucleus	–	+	++ / + + +	–	+ / + +	++ / + + +	+++	++ / + + +	+
Lateral geniculate nucleus	++ / + + +	+ / –	+ / + +	–	++	++	++	+++	++
Brainstem									
Superior colliculus	+	+	+	–	+	+	+	+	+
Inferior colliculus	+	+	+	–	+	+	+	+	+
Cerebellum	+++	+ / + +	++ / + + +	–	+	+++	+	+++	++ / + + +
Circumventricular organs									
Choroid plexus	–	–	–	–	–	+++	–	–	–

Relative expression is indicated as follows: + + +, very high; + + / + + +, high; ++, moderate; + / + +, low moderate; +, low; + / –, very low or hard to detect; –, not expressed. Adcy, adenylylate cyclase.





**Fig. 4.** Different expression of adenylyl cyclase mRNA in rat and mouse hippocampus. Macroscopic photographs of autoradiographic film images of coronal sections showing mRNA hybridization pattern of Adcy1 (A), Adcy2 (B), Adcy5 (C) and Adcy8 (D) in rat (A1–D1) and mouse (A2–D2) hippocampus. Note the differences in mRNA expression levels between species (black arrows). Scale bars = 300  $\mu$ m and 500  $\mu$ m.

hybridization signal in rat amygdala (Fig. 2I2). Low or no expression of Adcy7 and Adcy8 mRNAs was found in this brain region.

### 3.2.5. Limbic areas

Moderate or strong expression for all Adcy mRNAs was detected in at least one of the three fields of the cornu ammonis (CA1, CA2, CA3) and the dentate gyrus (DG) of the hippocampus of both species (Figs. 2 and 3), except for Adcy7, which was not present in mouse.

A strong Adcy1 mRNA hybridization signal was present in CA2 and DG in both rat and mouse brain and in the CA1 field of mouse (Fig. 4A1 and A2). Adcy2 mRNA was found at high hybridization levels in CA2 and DG of both species. We also observed a moderate hybridization signal in the CA1 region of rat coronal sections (Fig. 4B1). We found high hybridization signals of Adcy3 in CA2 and CA3 and moderate ones in CA1 and DG, in both rat and mouse (Figs. 2C2 and 3C2). There were no differences in mRNA expression levels between the two species in this case. There was a moderate hybridization signal for Adcy5 in the CA2 regions in both rat and mouse hippocampus. There was a low level of expression of Adcy5 mRNA in CA1, CA3 and DG of rat brain sections (Fig. 4C1), contrasting with its non-detection in the same hippocampal fields in mouse (Fig. 4C2). Adcy6 mRNA was expressed in all fields of rat and mouse hippocampus, though at a higher level in CA2 and DG (Figs. 2F2 and 3F2). There were no differences between the two species. Although we found expression of Adcy8 in all regions of the hippocampus, the CA1 field showed a remarkably high hybridization signal in mouse (Fig. 4D2). All three fields of CA and DG had a very high hybridization signal for Adcy9 mRNA in both rat and mouse brain sections (Figs. 2I2 and 3I2).

### 3.2.6. Thalamus and hypothalamus

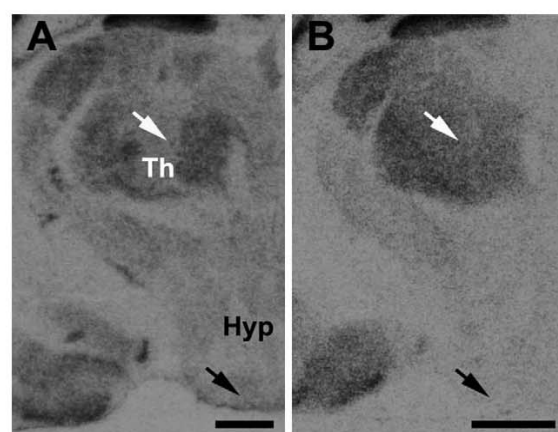
The mRNAs coding for Adcy2, Adcy3, Adcy5 and Adcy6 are weakly and uniformly expressed through the thalamus in both rat and mouse, whereas Adcy1, Adcy7, Adcy8 and Adcy9 mRNAs are present in both at high levels. Adcy1 mRNA expression in some thalamic nuclei was different between rat and mouse. We observed a strong hybridization signal for Adcy1 in the mouse posterior thalamic nuclear group (Fig. 5B), which was weaker in rat (Fig. 5A). The signal in the ventrolateral geniculate nucleus was also stronger in mouse brain. Adcy7 mRNA expression was only observed in mediodorsal thalamic nucleus of rat brain (Fig. 2G2). The moderate Adcy2 hybridization signal in the thalamic region was uniformly distributed in both species (Figs. 2C2 and 3C2), being higher in rat. In the hypothalamic nuclei, we found moderate

hybridization signals in Adcy5 and low ones in Adcy3, Adcy6, Adcy7, Adcy8 and Adcy9, in both mouse and rat (Figs. 2 and 3). There were, however, some differences between species in Adcy1 mRNA expression in the hypothalamus. There was no hybridization signal for Adcy1 in hypothalamic nuclei of mouse brain (Fig. 5B), whereas the expression appeared at low levels in rat brain (Fig. 5A). Very low levels of Adcy2 mRNA were seen in the hypothalamus of both species.

### 3.3. Adcy mRNA expression in glutamatergic cells

Glutamatergic cells were identified by the presence of the vesicular glutamate transporters vGluT1 and vGluT2 mRNAs and were detected simultaneously in tissue sections by Dig-labeled oligonucleotide probes. The presence of Adcy mRNAs was determined by  $^{33}$ P-labeled oligonucleotides.

A high proportion of the glutamatergic cells in the dentate gyrus and in pyramidal cell layers of the hippocampus (Fig. 6) were positive. We observed high levels of coexpression in limbic areas (CA1–CA3, DG) for Adcy1 (Fig. 6A–C), Adcy2 (Fig. 6D–F) and Adcy9 (Fig. 6J–L). Results are summarized in Table 4. We detected around



**Fig. 5.** Different expression of adenylyl cyclase 1 mRNA in rat and mouse in thalamic and hypothalamic nuclei. Macroscopic photographs of autoradiographic film images of coronal sections showing mRNA hybridization pattern of Adcy1 in rat (A) and mouse (B) thalamus and hypothalamus. Note the differences in mRNA expression levels between species (black and white arrows). Hyp, hypothalamus; Th, thalamus. Scale bars = 1 mm.

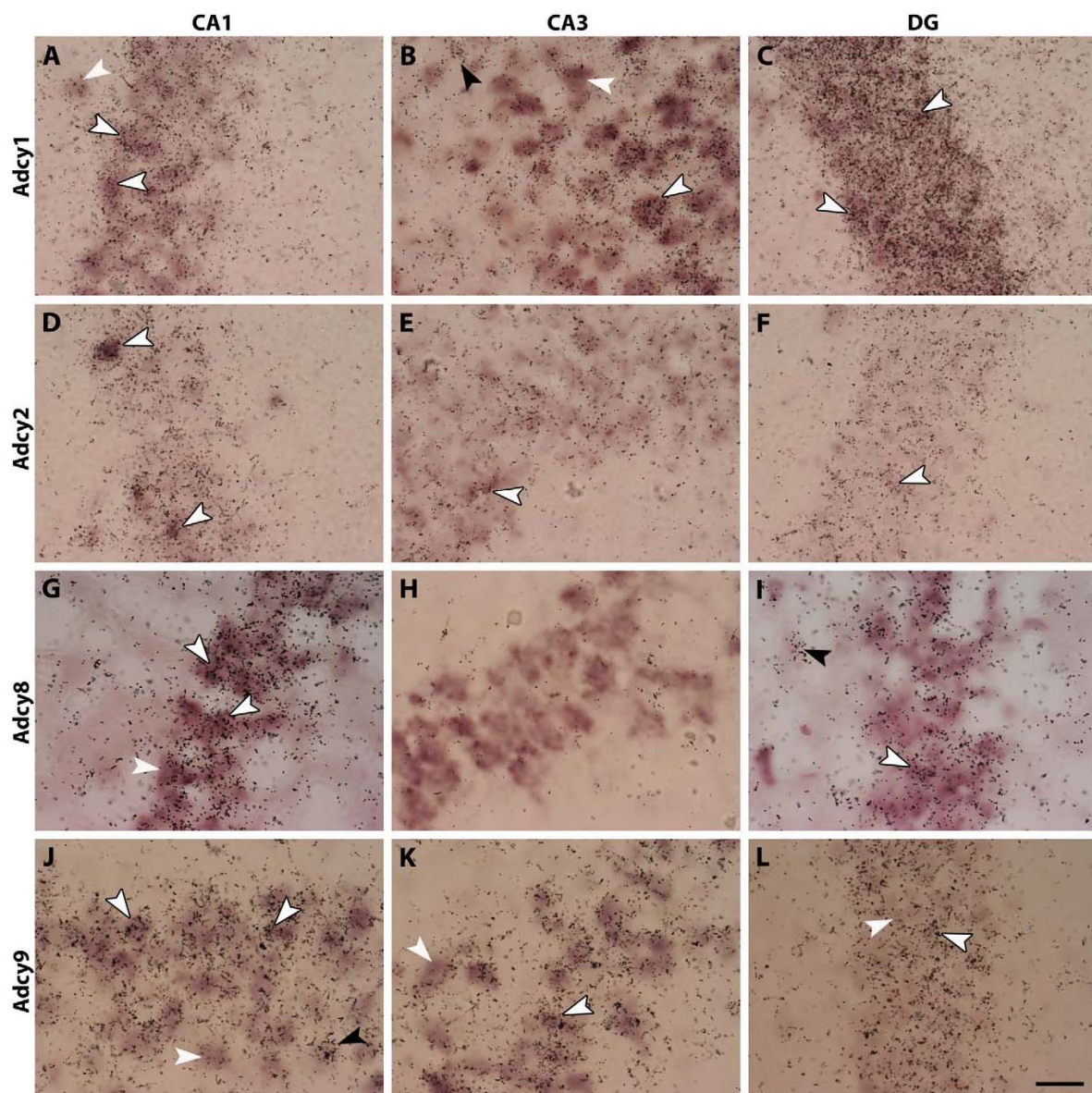


70–80% of glutamatergic cells expressing these three Adcy types in the CA1 region of the hippocampus. Adcy8 was found in 40% of glutamatergic cells in the CA1 field of the hippocampus (Fig. 6G). In DG, a vast majority of the glutamatergic cells (80–100%) (Fig. 6C and F) expressed Adcy1 and Adcy2, whereas in the CA3 field around 30% of these glutamatergic cells expressed Adcy1 or Adcy2 mRNA (Fig. 6B and E). For Adcy9, only 30% of DG vGluT-labeled cells also expressed the mRNA for this isoform (Fig. 6L), whereas 80% of co-localization was detected in the CA1, CA2 and CA3 fields (Fig. 6J and K). Low or very low mRNA co-expression of the other

Adcys studied was detected in the glutamatergic cell population of the limbic areas studied.

In the thalamic nuclei analyzed in this study (DGL and VPM), we found a high amount of Adcy1 mRNA in around 80% of the glutamatergic cells (Fig. 7A). A moderate percentage of vGluT-positive cells (50–60%) in this brain area co-expressed Adcy8 mRNA (Fig. 7B). Low or no co-localization was seen for the other Adcys.

In the piriform and cingulate cortex, most labeled cells (85%) were double-positive for vGluT and Adcy1 (Fig. 8A). The same



**Fig. 6.** Glutamatergic cells of limbic areas expressing adenyllyl cyclase isoform mRNA in mouse brain. High-magnification photomicrographs showing the simultaneous detection of two species of mRNA by using digoxigenin-labeled probes for vGluT mRNA and <sup>33</sup>P-labeled oligonucleotide probes for the mRNA of Adcy isoforms Adcy1 (A–C), Adcy2 (D–F), Adcy8 (G–I) and Adcy9 (J–L) in the pyramidal layer of the hippocampus (CA1 field; A, D, G, J; CA3 field; B, E, H, K) and in the dentate gyrus of the hippocampus (C, F, I, L) of mouse brain. White arrowheads point to digoxigenin-labeled cells, black arrowheads to radioactively-labeled cells and double white and black arrowheads to double-labeled cells. CA, Cornu Ammonis; DG, dentate gyrus; vGluT, vesicular glutamate receptor. Scale bar = 100 μm.

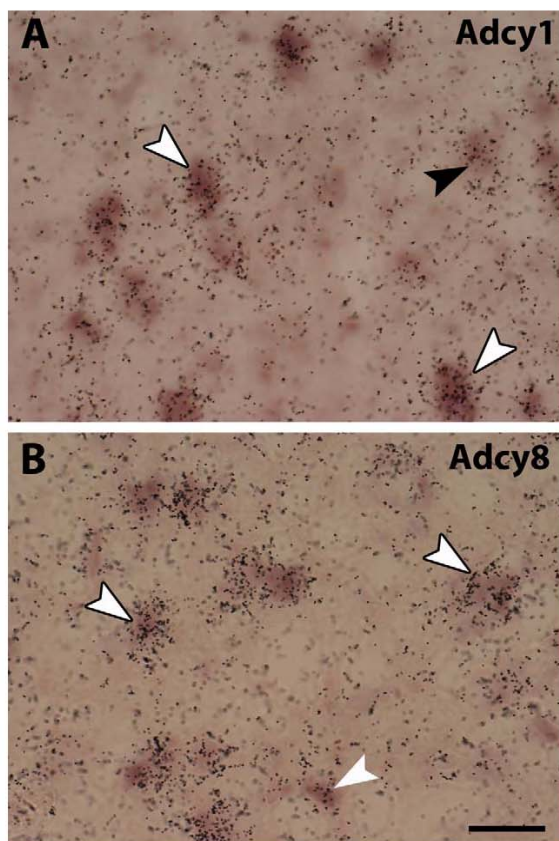


**Table 4**  
Quantification of the presence of adenylate cyclases mRNA in different neuronal populations in mouse brain.

		Adcy 1	Adcy 2	Adcy 3	Adcy 5	Adcy 6	Adcy 7	Adcy 8	Adcy 9
CPu	GAD high	71 ± 12	30 ± 31	11 ± 8	17 ± 3	13 ± 11	12 ± 10	10 ± 2	3 ± 3
	GAD low	13 ± 5	3 ± 0	6 ± 3	83 ± 6	4 ± 2	3 ± 1	4 ± 2	17 ± 1
	ChAT	66 ± 8	100 ± 0	34 ± 15	63 ± 4	58 ± 8	4 ± 1	2 ± 4	24 ± 6
Th	Glut	83 ± 6	0 ± 0	12 ± 2	23 ± 9	7 ± 4	10 ± 8	53 ± 19	28 ± 5
	GAD	69 ± 9	44 ± 40	8 ± 7	7 ± 7	21 ± 19	20 ± 3	18 ± 11	18 ± 10
CA1	Glut	88 ± 12	71 ± 8	13 ± 2	13 ± 8	7 ± 1	9 ± 8	44 ± 17	89 ± 1
	GAD	79 ± 17	6 ± 10	6 ± 10	5 ± 8	0 ± 0	13 ± 0	0 ± 0	8 ± 14
CA2	Glut	84 ± 18	36 ± 29	10 ± 6	27 ± 13	9 ± 7	5 ± 3	37 ± 24	81 ± 3
	GAD	64 ± 12	4 ± 4	11 ± 3	0 ± 0	11 ± 11	10 ± 14	0 ± 0	29 ± 12
CA3	Glut	34 ± 14	38 ± 13	13 ± 3	23 ± 15	7 ± 1	7 ± 6	9 ± 6	80 ± 2
	GAD	82 ± 16	37 ± 17	11 ± 10	0 ± 0	11 ± 10	5 ± 7	10 ± 14	0 ± 0
DG	Glut	100 ± 0	84 ± 3	6 ± 9	18 ± 9	7 ± 2	9 ± 5	14 ± 4	34 ± 6
	GAD	74 ± 6	30 ± 9	9 ± 9	7 ± 2	18 ± 19	10 ± 9	37 ± 9	10 ± 5
CgCx	Glut	85 ± 1	52 ± 15	24 ± 17	21 ± 6	9 ± 5	9 ± 4	47 ± 16	36 ± 2

Quantification was performed in different brain regions of control mice brains. Data are the mean ± SD of four animals and represent the percentage of counted cells, GABAergic neurons (GAD), glutamatergic neurons (Glut) and cholinergic neurons (ChAT), expressing an Adcy isoform mRNA. The number of cells counted in each region was maintained for all sections analyzed. Adcy, adenylate cyclase; CA, *Cornu Ammonis*; CgCx, cingulate cortex; ChAT; choline acetyltransferase; CPu, caudate-putamen; DG, dentate gyrus; GAD, glutamic acid decarboxylase; Glut, glutamatergic; Th, thalamus.

proportion of glutamatergic cells (52 and 47%) expressed Adcy2 and Adcy8 mRNAs (Fig. 8B and C). A lower percentage of vGluT-positive cells (24–36%) also hybridized for Adcy3, Adcy5 and Adcy9 mRNAs (Fig. 8D).



**Fig. 7.** Glutamatergic cells of thalamic nucleus expressing adenylate cyclase isoform mRNA in mouse brain. High-magnification photomicrographs showing the simultaneous detection of two species of mRNA by using digoxigenin-labeled probes for vGluT mRNA and <sup>33</sup>P-labeled oligonucleotide probes for the mRNA of Adcy isoforms Adcy1 (A) and Adcy8 (B) in the ventral posterior thalamic nucleus of mouse brain. White arrowheads point to digoxigenin-labeled cells, black arrowheads to radioactively-labeled cells and double white and black arrowheads to double-labeled cells. vGluT, vesicular glutamate receptor. Scale bar = 20 μm.

**3.4. Adcy mRNA expression in GABAergic cells**

GABAergic cells were identified by the presence of glutamic acid decarboxylase (GAD65 and GAD67) mRNAs and were detected in tissue sections by using Dig-labeled probes. The presence of Adcy mRNAs was determined by <sup>33</sup>P-labeled oligonucleotides.

Most GABAergic cells in the dentate gyrus (Fig. 9C) and in the pyramidal cell layer of the hippocampus (Fig. 9A and B) also expressed Adcy1 mRNA. No or low co-expression was observed for other Adcy mRNAs in the hippocampus. We also found moderate co-localization, around 70%, for the Adcy1 isoform in the GABAergic cell population of piriform and cingulate cortex (Fig. 9D). Around 30–37% of co-localization was observed in these cortical areas for Adcy2 and Adcy8 mRNAs.

We detected two differentiated GABAergic cell populations in the striatum: high GAD mRNA-expressing cells (interneurons or large striatonigral projection neurons) and low GAD mRNA-expressing cells (medium-spiny projection neurons). Adcy5 was the only isoform expressed in about 70% of the low GAD mRNA-expressing cells (Fig. 10B). For high GAD mRNA-expressing neurons, only Adcy1 mRNA was highly expressed (in 80%) in the striatum (Fig. 10A). The results are summarized in Table 4.

**3.5. Adcy mRNA expression in cholinergic cells**

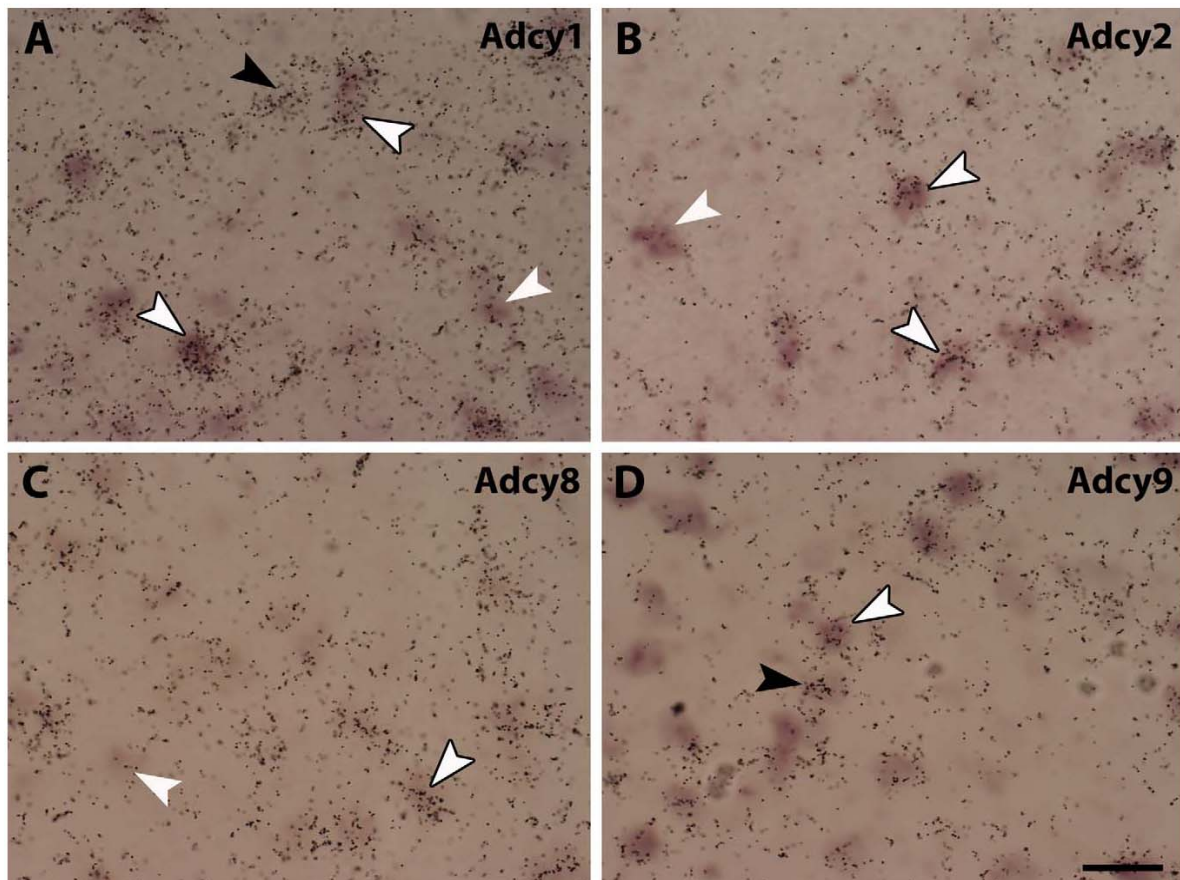
Cholinergic cells were distinguished by the presence of choline acetyltransferase (ChAT) mRNA. We detected these cells in the striatum by use of non-radioactive probes. The presence of Adcy mRNAs was determined by <sup>33</sup>P-labeled oligonucleotides.

All ChAT mRNA-positive cells in the striatum expressed Adcy2 mRNA (Fig. 11B): this was the only cell population in striatum where this enzyme subunit was expressed. Adcy1, Adcy5 and Adcy6 mRNAs were also detected in about 60% of the cholinergic cells of the striatum (Fig. 11A, C and D). The results are summarized in Table 4.

**4. Discussion**

In this work we have carried out a comparative analysis of the mRNA distribution of the nine Adcy isoforms in rat and mouse brain. This study constitutes, to our knowledge, the first detailed comparative study of these enzymes in rat and mouse brain.

We have also examined the presence of the mRNAs coding for these Adcy isoforms in glutamatergic, GABAergic and cholinergic



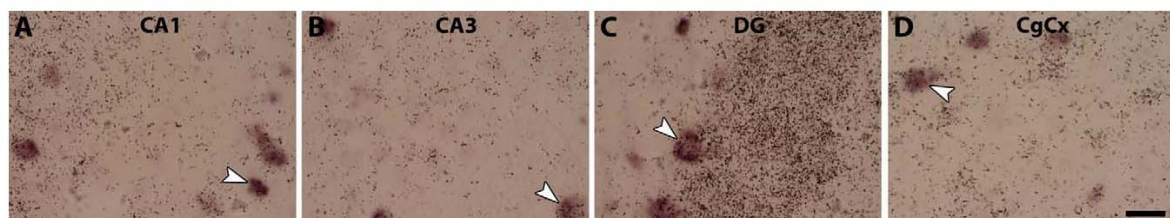
**Fig. 8.** Glutamatergic cells of cingulate cortex expressing adenylyl cyclase isoform mRNA in mouse brain. High-magnification photomicrographs showing the simultaneous detection of two species of mRNA by using digoxigenin-labeled probes for vGluT mRNA and <sup>33</sup>P-labeled oligonucleotide probes for the mRNA of Adcy isoforms Adcy1 (A), Adcy2 (B), Adcy8 (C) and Adcy9 (D) in the cingulate cortex of mouse brain. White arrowheads point to digoxigenin-labeled cells, black arrowheads to radioactively-labeled cells and double white and black arrowheads to double-labeled cells. vGluT, vesicular glutamate receptor. Scale bar = 20 μm.

cells in selected mouse brain structures. Although it is known that some Adcy isoforms are involved in neural processes (Mons et al., 1998a,b; Lee et al., 2002), here we discuss the possible role of other Adcys during learning and memory or striatum function.

#### 4.1. Adcys mRNA expression in rodent brain

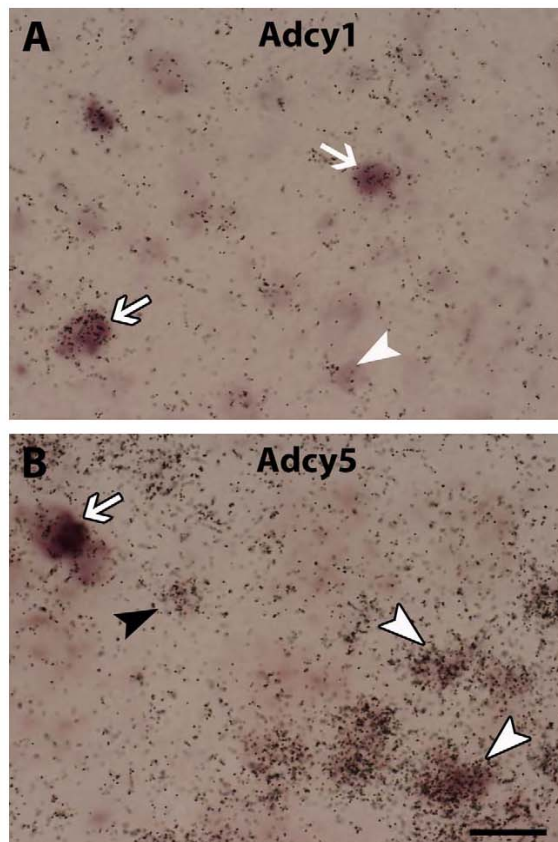
We found Adcy1 mRNA expressed mostly in the hippocampus, the cerebellum, thalamic nuclei and neocortical structures in

mouse and rat brain, in agreement with previous studies (Xia et al., 1991; Mons et al., 1998a,b; Visel et al., 2006; Conti et al., 2007). Our results confirmed that Adcy2 mRNA is mostly expressed in limbic areas in agreement with (Mons et al., 1998a,b; Baker et al., 1999; Visel et al., 2006), where it has an important role on spatial memory acquisition (Mons et al., 2003). Adcy3 mRNA is expressed widespread in the brain (Visel et al., 2006), but has important functions in the olfactory system, where is a key component of the odorant receptor signaling cascade (Zou et al., 2007). We do not



**Fig. 9.** GABAergic cells of the hippocampus and cingulate cortex expressing adenylyl cyclase 1 isoform mRNA in mouse brain. High-magnification photomicrographs showing the simultaneous detection of two species of mRNA by digoxigenin-labeled probes for GAD65/67 mRNA and <sup>33</sup>P-labeled oligonucleotide probes for the mRNA of Adcy1 isoform in the pyramidal layer of the hippocampus (CA1 field; A; CA3 field; B), in the dentate gyrus of the hippocampus (C) and in the cingulate cortex (D) of mouse brain. Double white and black arrowheads point to double-labeled cells. CA, *Comu Ammonis*; CgCx, cingulate cortex; DG, dentate gyrus; GAD, glutamic acid decarboxylase. Scale bar = 20 μm.





**Fig. 10.** GABAergic cells of the striatum expressing adenylyl cyclase isoform mRNA in mouse brain. High-magnification photomicrographs showing the simultaneous detection of two species of mRNA by using digoxigenin-labeled probes for GAD65/67 mRNA and  $^{33}\text{P}$ -labeled oligonucleotide probes for the mRNA of Adcy isoforms Adcy1 (A) and Adcy5 (B) in the striatum of mouse brain. White arrowheads point to low GAD65/67 mRNA-expressing cells, white arrows to high GAD65/67 mRNA-expressing cells, black arrowheads to radioactively-labeled cells and double white and black arrows and arrowheads to double-labeled cells. GAD, glutamic acid decarboxylase. Scale bar = 20  $\mu\text{m}$ .

found Adcy4 mRNA expression in rodent brain, confirming previous reports (Visel et al., 2006) where they used a labeled riboprobe. However, some authors found Adcy4 protein expression in mouse hippocampus, where it may play a crucial role in certain forms of synaptic plasticity (Baker et al., 1999). Adcy5 mRNA expression was high in the olfactory tubercle and the striatum, where it plays a key role in the dopaminergic signaling cascade (Mons et al., 1998a,b; Lee et al., 2002; Visel et al., 2006). Widespread and moderate expression was observed for Adcy6 mRNA in rodent brain (Visel et al., 2006), but a high mRNA expression could also be detected in the choroid plexus. While some authors found Adcy7 protein expression in several brain nuclei (Mons et al., 1998a,b), we could only detect Adcy7 mRNA expression in some thalamic and hypothalamic nuclei. The discrepancy of our results on Adcy7 with those found by Mons and coworkers (1998a,b) in the rat brain expression pattern could be explained by the different methodology used. They detect the expression of Adcy7 by immunohistochemistry using polyclonal antibodies which could be rather different in terms of levels of expression or brain areas where they are localized (not only cell bodies can be labeled as in the *in situ* hybridization experiments) but also terminals and dendrites. Adcy8 mRNA was found

abundantly expressed in the hippocampus, cerebellum, cortex, thalamus and hypothalamus, confirming previous reports (Cali et al., 1994; Conti et al., 2007). Referring to Adcy9, its mRNA was abundantly observed in neocortex and hippocampus, as described previously (Premont et al., 1996; Antoni et al., 1998).

The distribution of the different nine Adcy isoform mRNAs in mouse brain was found to be fundamentally similar to that described previously in rat (Matsuoka et al., 1992, 1997; Mons et al., 1998a,b), in displaying predominant locations in brain areas involved in a variety of functions (motor, sensorial, etc.). Differences in the intensity of expression between some cell groups within both species were apparent and could be relevant to questions such as for example how rats and mice are used to model several aspects of the regulation of some processes through cAMP levels regulation such as those involved in memory or neuroinflammatory response. Among the regions displaying such differences were (1) the CA fields and dentate gyrus of the hippocampus for Adcy1, Adcy2, Adcy5 and Adcy8 and (2) the thalamus, where Adcy1 presented very high hybridization levels in some thalamic nuclei in mouse.

#### 4.2. Hippocampus: learning and memory implications

The  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-stimulated Adcys, Adcy1 and Adcy8, have an essential role in synaptic plasticity and are required for learning and memory processes (Wong et al., 1999; Zhang et al., 2008; Masada et al., 2009). Double-knockout mice show no late phase-long term potentiation and are deficient in long-term memory (Wong et al., 1999). These two isoforms are expressed in areas associated with learning and memory (Xia et al., 1991; Conti et al., 2007), including neocortex and hippocampus.

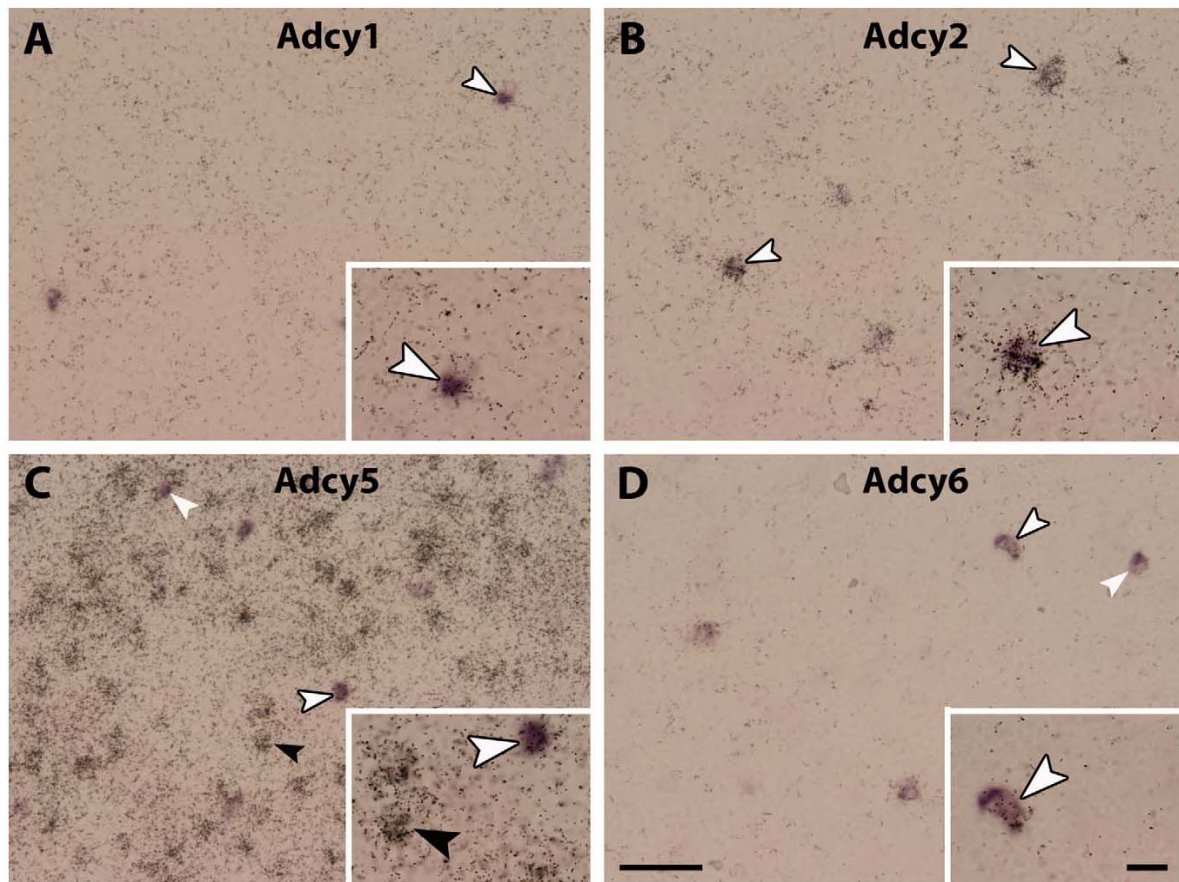
The high co-localization observed for Adcy1 in glutamatergic and GABAergic neurons in the hippocampus points to the importance of this enzyme's role in the synaptic plasticity of glutamatergic and GABAergic hippocampal terminals. Since Adcy1 is neurospecific (Xia et al., 1991), it may be a useful drug target to modulate synaptic plasticity.

Other Adcy isoforms are also involved in learning and memory. Adcy2, a  $\text{Ca}^{2+}$ -insensitive/ $\text{G}_{\beta\gamma}$ -stimulated Adcy, is found transcriptionally downregulated during early stages of spatial learning tasks (Mons et al., 2003). In addition, we found this isoform highly expressed in glutamatergic CA1 neurons of control mice, which supports its possible role in learning tasks. Adcy9, which we found highly expressed in most CA1–CA2 and CA3 glutamatergic neurons, is a calcineurin-activated Adcy isoform. It is activated by  $\text{Ca}^{+2}$ , producing increased levels of cAMP in hippocampal neurons *in vitro* (Chan et al., 2005). For these, Adcy9 may contribute to synaptic plasticity, including some forms of learning and memory (Antoni et al., 1998).

#### 4.3. Striatum: dopaminergic and cholinergic functions

We only found high mRNA expression of Adcy1 and Adcy5 in GABAergic cell population in this brain region. The striatum is the main expression site of Adcy5 mRNA, where it is required for  $\text{D}_2$  dopamine receptor function (Lee et al., 2002). High co-expression of Adcy5, and dopamine  $\text{D}_1$  and  $\text{D}_2$  receptors, is found in this brain nucleus (Gortari and Mengod, 2009).  $\text{D}_1$  receptors are coupled to  $\text{G}_s$ -stimulated Adcys, like Adcy1, or a non-Adcy effector system like phospholipase C (PLC); whereas  $\text{D}_2$  receptors are coupled to  $\text{G}_{i\alpha}$ -inhibited Adcys, like Adcy5 (Sidhu and Niznik, 2000). Our results indicate that Adcy5 mRNA is mainly expressed in medium-spiny neurons (GABAergic interneurons) in the striatum. These neurons account for 90% of the GABAergic neurons in this brain region and express both  $\text{D}_1$  and  $\text{D}_2$  receptors. These results, in addition to previous reports (Gortari and Mengod, 2009), could indicate that





**Fig. 11.** Cholinergic cells of the striatum expressing adenylyl cyclase isoform mRNA in mouse brain. High-magnification photomicrographs showing the simultaneous detection of two species of mRNA by using  $^{33}\text{P}$ -labeled oligonucleotide probes for Adcy1 (A), Adcy2 (B), Adcy5 (C) and Adcy6 (D) isoforms (silver grains) and digoxigenin-labeled probes for ChAT mRNA in the striatum of mouse brain. White arrowheads point to digoxigenin-labeled cells, black arrowheads to radioactively-labeled cells and double white and black arrowheads to double-labeled cells. ChAT, choline acetyltransferase. Scale bars = 100  $\mu\text{m}$  and 20  $\mu\text{m}$  in the magnification boxes.

Adcy5 is coupled with the  $\text{D}_2$  dopamine receptor in GABAergic medium-spiny neurons of the striatum, and that Adcy5 in the striatum is involved in corticostriatal dopamine-dependent plasticity and striatum-dependent learning (Kheirbek et al., 2009). In the other GABAergic cell population found in the striatum, large striatonigral projecting neurons or fast-spiking neurons, we found that only Adcy1 mRNA was highly expressed. This may indicate that dopamine  $\text{D}_1$  receptors, in this case, could be coupled to this enzyme.

Other types of neurons present in the striatum are the large spiny cholinergic interneurons, which account for 2% or less of the total neuronal striatal population. These cells, also called tonically active neurons, receive dopaminergic signals, have projecting axons to both populations of striatal GABAergic cells (Tepper and Bolam, 2004) and express  $\text{D}_1$ -like dopamine receptors. Adcy2 mRNA was found, surprisingly, highly expressed in all cholinergic neurons of the striatum. This may represent the Adcy2-signaling pathway's involvement in cholinergic modulation of GABAergic neurons. The low densities of silver grains observed in around 50% of cholinergic interneurons for the other Adcy mRNAs like Adcy1, Adcy5 and Adcy6 suggests that Adcy2 is probably the most important Adcy present in these neurons, where it may be coupled with  $\text{D}_1$ -like dopamine receptors, but we cannot exclude the other Adcys and other receptors dependent on Adcy-cAMP signaling

pathways. We discussed above that  $\text{D}_1$ -like receptors can also be coupled with Adcy1, and that Adcy5 or Adcy6 could be coupled with  $\text{D}_2$  receptors, which are also found in cholinergic neurons in the striatum (Dawson et al., 1988; Alcantara et al., 2003). Furthermore, Adcys may also be involved in acetylcholine release from vesicles in these cells (Login, 1997).

## 5. Conclusions

The results reported here on the neuroanatomical and neuronal localization of the isoforms of Adcy mRNAs in rat and mouse brains is a starting point for a more profound study of these enzymes, which might lead to their consideration as new therapeutic targets. More co-localization studies between Adcys and G-protein-coupled receptors are needed in order to establish which Adcy isoform is coupled to which receptor in these neuronal pathways. Understanding the specific Adcy-effector system for each receptor could be useful for drug treatments with Adcy isoform-specific inhibitors (Pierre et al., 2009).

## Ethical statement

All experimental procedures followed the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC), and

were approved by the ethic committee of the University of Barcelona and of the Generalitat de Catalunya.

### Acknowledgements

This work was supported by grants awarded by the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia and FEDER Funds (SAF2006-10243, SAF 2009-11052) and by the Generalitat de Catalunya (SGR2009/220). Cristina Sanabra was a recipient of a fellowship from the IDIBAPS. We thank Robin Rycroft for English corrections.

### References

- Alcantara, A.A., Chen, V., Herring, B.E., Mendenhall, J.M., Berlanga, M.L., 2003. Localization of dopamine D2 receptors on cholinergic interneurons of the dorsal striatum and nucleus accumbens of the rat. *Brain Res.* 986, 22–29.
- Antoni, F.A., Palkovits, M., Simpson, J., Smith, S.M., Leitch, A.L., Rosie, R., Fink, G., Paterson, J.M., 1998.  $Ca^{2+}$ /calmodulin-inhibited adenylyl cyclase, highly abundant in forebrain regions, is important for learning and memory. *J. Neurosci.* 18, 9650–9661.
- Baker, L.P., Nielsen, M.D., Impey, S., Hacker, B.M., Poser, S.W., Chan, M.Y., Storm, D.R., 1999. Regulation and immunohistochemical localization of betagamma-stimulated adenylyl cyclases in mouse hippocampus. *J. Neurosci.* 19, 180–192.
- Bishop, G.A., Berbari, N.F., Lewis, J., Mykytyn, K., 2007. Type III adenylyl cyclase localizes to primary cilia throughout the adult mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 505, 562–571.
- Cali, J.J., Zwaagstra, J.C., Mons, N., Cooper, D.M., Krupinski, J., 1994. Type VIII adenylyl cyclase A  $Ca^{2+}$ /calmodulin-stimulated enzyme expressed in discrete regions of rat brain. *J. Biol. Chem.* 269, 12190–12195.
- Chan, G.C., Tonegawa, S., Storm, D.R., 2005. Hippocampal neurons express a calcineurin-activated adenylyl cyclase. *J. Neurosci.* 25, 9913–9918.
- Conti, A.C., Maas Jr., J.W., Muglia, L.M., Dave, B.A., Vogt, S.K., Tran, T.T., Rayhel, E.J., Muglia, L.J., 2007. Distinct regional and subcellular localization of adenylyl cyclases type 1 and 8 in mouse brain. *Neuroscience* 146, 713–729.
- Cooper, D.M., 2005. Compartmentalization of adenylyl cyclase and cAMP signaling. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 1319–1322.
- Dawson, V.L., Dawson, T.M., Filloux, F.M., Wamsley, J.K., 1988. Evidence for dopamine D-2 receptors on cholinergic interneurons in the rat caudate-putamen. *Life Sci.* 42, 1933–1939.
- Defer, N., Best-Belpomme, M., Hanoune, J., 2000. Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 279, F400–F416.
- Feinstein, P.G., Schrader, K.A., Bakalyar, H.A., Tang, W.J., Krupinski, J., Gilman, A.G., Reed, R.R., 1991. Molecular cloning and characterization of a  $Ca^{2+}$ /calmodulin-insensitive adenylyl cyclase from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 10173–10177.
- Gortari, P.D., Mengod, G., 2009. Dopamine D1, D2 and mu-opioid receptors are co-expressed with adenylyl cyclase 5 and phosphodiesterase 7B mRNAs in striatal rat cells. *Brain Res.*
- Hanoune, J., Defer, N., 2001. Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 145–174.
- Ishii, K., Oda, Y., Ichikawa, T., Deguchi, T., 1990. Complementary DNAs for choline acetyltransferase from spinal cords of rat and mouse: nucleotide sequences, expression in mammalian cells, and in situ hybridization. *Mol. Brain Res.* 7, 151–159.
- Kheirbek, M.A., Britt, J.P., Beeler, J.A., Ishikawa, Y., McGehee, D.S., Zhuang, X., 2009. Adenylyl cyclase type 5 contributes to corticostriatal plasticity and striatum-dependent learning. *J. Neurosci.* 29, 12115–12124.
- Krupinski, J., Cali, J.J., 1998. Molecular diversity of the adenylyl cyclases. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* 32, 53–79.
- Landry, M., Holmberg, K., Zhang, X., Hokfelt, T., 2000. Effect of axotomy on expression of NPY, galanin, and NPY Y1 and Y2 receptors in dorsal root ganglia and the superior cervical ganglion studied with double-labeling in situ hybridization and immunohistochemistry. *Exp. Neurol.* 162, 361–384.
- Lee, K.W., Hong, J.H., Choi, I.Y., Che, Y., Lee, J.K., Yang, S.D., Song, C.W., Kang, H.S., Lee, J.H., Noh, J.S., Shin, H.S., Han, P.L., 2002. Impaired D2 dopamine receptor function in mice lacking type 5 adenylyl cyclase. *J. Neurosci.* 22, 7931–7940.
- Login, I.S., 1997. D2 dopamine receptor activation inhibits basal and forskolin-evoked acetylcholine release from dissociated striatal cholinergic interneurons. *Brain Res.* 749, 147–151.
- Masada, N., Ciruela, A., Macdougall, D.A., Cooper, D.M., 2009. Distinct mechanisms of regulation by  $Ca^{2+}$ /calmodulin of type 1 and 8 adenylyl cyclases support their different physiological roles. *J. Biol. Chem.* 284, 4451–4463.
- Matsuoka, I., Giulii, G., Poyard, M., Stengel, D., Parma, J., Guellaen, G., Hanoune, J., 1992. Localization of adenylyl and guanylyl cyclase in rat brain by in situ hybridization: comparison with calmodulin mRNA distribution. *J. Neurosci.* 12, 3350–3360.
- Matsuoka, I., Suzuki, Y., Defer, N., Nakanishi, H., Hanoune, J., 1997. Differential expression of type I, II, and V adenylyl cyclase gene in the postnatal developing rat brain. *J. Neurochem.* 68, 498–506.
- Mons, N., Decorte, L., Jaffard, R., Cooper, D.M., 1998a.  $Ca^{2+}$ -sensitive adenylyl cyclases, key integrators of cellular signalling. *Life Sci.* 62, 1647–1652.
- Mons, N., Guillou, J.L., Decorte, L., Jaffard, R., 2003. Spatial learning induces differential changes in calcium/calmodulin-stimulated (ACI) and calcium-insensitive (ACII) adenylyl cyclases in the mouse hippocampus. *Neurobiol. Learn. Mem.* 79, 226–235.
- Mons, N., Guillou, J.L., Jaffard, R., 1999. The role of  $Ca^{2+}$ /calmodulin-stimulable adenylyl cyclases as molecular coincidence detectors in memory formation. *Cell Mol. Life Sci.* 55, 525–533.
- Mons, N., Yoshimura, M., Ikeda, H., Hoffman, P.L., Tabakoff, B., 1998b. Immunological assessment of the distribution of type VII adenylyl cyclase in brain. *Brain Res.* 788, 251–261.
- Patel, T.B., Du, Z., Pierre, S., Cartin, L., Scholich, K., 2001. Molecular biological approaches to unravel adenylyl cyclase signaling and function. *Gene* 269, 13–25.
- Pierre, S., Eschenhagen, T., Geisslinger, G., Scholich, K., 2009. Capturing adenylyl cyclases as potential drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 321–335.
- Pompeiano, M., Palacios, J.M., Mengod, G., 1992. Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT1A receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. *J. Neurosci.* 12, 440–453.
- Premont, R.T., Matsuoka, I., Mattei, M.G., Pouille, Y., Defer, N., Hanoune, J., 1996. Identification and characterization of a widely expressed form of adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 271, 13900–13907.
- Risoe, P.K., Wang, Y., Stuestol, J.F., Aasen, A.O., Wang, J.E., Dahle, M.K., 2007. Lipopolysaccharide attenuates mRNA levels of several adenylyl cyclase isoforms in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 1772, 32–39.
- Serrats, J., Artigas, F., Mengod, G., Cortés, R., 2003. GABAB receptor mRNA in the raphe nuclei: co-expression with serotonin transporter and glutamic acid decarboxylase. *J. Neurochem.* 84, 743–752.
- Sidhu, A., Niznik, H.B., 2000. Coupling of dopamine receptor subtypes to multiple and diverse G proteins. *Int. J. Dev. Neurosci.* 18, 669–677.
- Schmitz, G.G., Walter, T., Seibl, R., Kessler, C., 1991. Nonradioactive labeling of oligonucleotides in vitro with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase. *Anal. Biochem.* 192, 222–231.
- Tepper, J.M., Bolam, J.P., 2004. Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 685–692.
- Tomiyama, M., Palacios, J.M., Cortés, R., Vilaró, M.T., Mengod, G., 1997. Distribution of AMPA receptor subunit mRNAs in the human basal ganglia: an in situ hybridization study. *Mol. Brain Res.* 46, 281–289.
- Visel, A., Alvarez-Bolado, G., Thaller, C., Eichele, G., 2006. Comprehensive analysis of the expression patterns of the adenylyl cyclase gene family in the developing and adult mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 496, 684–697.
- Wong, S.T., Athos, J., Figueroa, X.A., Pineda, V.V., Schaefer, M.L., Chavkin, C.C., Muglia, L.J., Storm, D.R., 1999. Calcium-stimulated adenylyl cyclase activity is critical for hippocampus-dependent long-term memory and late phase LTP. *Neuron* 23, 787–798.
- Xia, Z.G., Refsdal, C.D., Merchant, K.M., Dorsa, D.M., Storm, D.R., 1991. Distribution of mRNA for the calmodulin-sensitive adenylyl cyclase in rat brain: expression in areas associated with learning and memory. *Neuron* 6, 431–443.
- Zhang, M., Moon, C., Chan, G.C., Yang, L., Zheng, F., Conti, A.C., Muglia, L., Muglia, L.J., Storm, D.R., Wang, H., 2008. Ca-stimulated type 8 adenylyl cyclase is required for rapid acquisition of novel spatial information and for working/episodic-like memory. *J. Neurosci.* 28, 4736–4744.
- Zou, D.J., Chesler, A.T., Le Pichon, C.E., Kuznetsov, A., Pei, X., Hwang, E.L., Firestein, S., 2007. Absence of adenylyl cyclase 3 perturbs peripheral olfactory projections in mice. *J. Neurosci.* 27, 6675–6683.