



**FOSFODIESTERASAS DEL AMP_c Y DEL GMP_c EN EL
CEREBRO: EXPRESIÓN EN PROCESOS
NEUROINFLAMATORIOS Y NEURODEGENERATIVOS**

Elisabet Reyes Irisarri
Barcelona 2007

DEPARTAMENT DE NEUROFARMACOLOGIA
INSTITUT D'INVESTIGACIONS BIOMÈDIQUES DE BARCELONA (IIBB)
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)
INSTITUT D'INVESTIGACIONS BIOMÈDIQUES AUGUST PI I SUNYÉ (IDIBAPS)

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad de Barcelona, dentro del programa de doctorado de Neurociencias (Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona)

La directora:

Dra. Guadalupe Mengod
Profesora de Investigación
CSIC

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2003-02083, SAF2006-10243) y la Fundació La Marató de TV3 (#1017/97).

A mis padres, Rosa M^a y José,
a mi hermana Rosana
y a mi sobrina Paula.

Me alegra disponer de un espacio en el que poder expresar mis agradecimientos a todas las personas que me han acompañado, y con ello han contribuido, en el desarrollo de este trabajo, bien sea directamente con sus conocimientos y consejos y/o bien indirectamente con su compañía y amistad. Muchas han sido las personas con las que he compartido esta etapa de mi vida, a todas ellas muchísimas gracias! ... me gustaría dedicar unas líneas especialmente,

A Lupe, parte imprescindible en este trabajo, muchas gracias por la confianza depositada en mí para continuar con esta línea de trabajo y por permitirme presentarlo en el otro lado del Atlántico, por cuidarme tan bien, por tu carácter siempre alegre, por tu enorme capacidad de empatía y comprensión, por todo lo que me has enseñado, por el *superspring* final y por demostrarme, una vez más, que hay pocas cosas imposibles...Muchas gracias, jefa!

A la Roser, gràcies per tots els consells científics i financers i pels de la meva etapa badalonina, per la teva manera de fer les coses "el més correcte possible" i per estar sempre oberta a fer una "xerradeta" amb aquesta manera d'expressar-te tan "còmic-dramàtica". Moltes mercès!

A la Teresa, moltes gràcies per l'interés mostrat tant a nivell científic com personal durant aquesta etapa, pels teus consells d'anglès i per la teva manera de fer al laboratori tan organitzada.

I a les tres *jefas* en conjunt, us voldria agrair el fet de tenir la porta del despatx sempre oberta a qualsevol consulta. Moltíssimes gràcies per poder comptar amb vosaltres!

A todos los compañeros de viaje del laboratorio 628 que, en algún momento me han sufrido, y me han hecho disfrutar durante esta etapa. A los de antes: moltes gràcies a la Silvia i a en Jordi per tot el que em van ensenyar sobre el món de la *in situ* d'una manera totalment desinteressada i per acollir-me al laboratori en els primers moments de la tesi. Gràcies també a la Cesca, per les seves converses entre rentat i rentat. A mi generació: a Noe, gracias mil por los buenos momentos que he pasado a tu lado, por esos conciertos en el *hotlab*, por esas charlas de ciencia y de vida y por todos esos abrazos. A l'Anna, l'empresària del labo, moltes gràcies per transmetre'm la teva serenitat, pels teus consells, per les nostres converses de la vida en general i per les teves adopcions quan ho he necessitat. A Julián - de esta no te *escaquías*- un *mishón de gracias* por ese sentido del humor excelente y por tus tan escuetas como acertadas frases. A Raúl, el blanco con alma de negro, gracias por darme la oportunidad de practicar el alemán y darme cuenta de lo mucho que me falta por aprender y a Pablo, gracias por la ayuda informática cuando la he necesitado. Y a las chiquilinas del labo: muchas gracias a Rocío, por tu claridad, tu temperamento y tu ironía (que me encanta!), a la Cris per la teva tendresa i per tenir sempre un moment per a xerrar y a ambas por vuestra ayuda en la etapa final experimental de esta tesis, y a Emili por esas preguntas que me demuestran que debo seguir estudiando. A todos vosotros muchas gracias por estar aquí!

También quiero dar las gracias a Laura, mi euskaldun neska, muchas gracias por ese interés científico y por esa preocupación personal y por ese aire vasco que le das al laboratorio y que tanto me gusta, un *muxu!* A Paula (alias Poli), por su manera tan cómica y clara de explicar cualquier tema, científico o personal. A Patricia, *muchisísimas gracias* por esos comentarios sobre los artículos y por tu interés constante, por esos *delisiosos dulces* de tamarindo y por compartir tu experiencia conmigo. And I would like to thank Fumi, our Japanese master of immunohistochemistry, thank you very much for all you have taught me about science and japanese culture and for the enjoyable english classes.

Me gustaría dar las gracias también a una prolongación del laboratorio 628, el departamento de histología donde he pasado muchísimas horas cortando y tiñendo y que se han pasado mucho más rápido gracias a la compañía de sus integrantes: Muchas gracias Keles, mi rubia preferida, por tu amistad y tu cariño, Olga, *miña nena*, por tus risas y tu alegría contagiosa, Sílvia por ese ácido sentido del humor y a Nacho por esa alegría salmantina.

Graag gedaan to Jan and Marjanne, my "bosses" in Maastricht, for all you taught me and for your nice and kindly welcome. Y a las chicas Joe, Nieves y Neus por esas cenas hispanoholandesas tan amenas.

També m'agradaria donar les gràcies als seniors del departament de Neurofarmacologia de l'IIBB, per ser un exemple de bona convivència en la ciència, i especialment a en Paco i l'Albert, per tenir sempre una paraula agradable a dir i a l'Emili, per la seva paciència y el seu ajut en la complexitat estadística. Y por supuesto, muchas gracias a nuestras *secres*, Isabel y María, por su profesionalidad en el trabajo y por su buen carácter, y a la Montse Roig per facilitar-nos sempre la feina.

También me gustaría dar las gracias al resto de jóvenes promesas del departamento por el buen ambiente que se respira. Al laboratorio de los Pacos, a los de antes y a los de ahora, y en especial a Analía, por cómo es y por sus conversaciones, y a Xavi, por esas clases de inglés tan divertidas. A tots els NQ3, especialment a la Iolanda i la Mireia, pel seu afecte i serenitat, i a en Ruben pel seu ajut informàtic. Y a las promesas de otros departamentos del IIBB en especial a Aroa, por su interés personal, a Lola, la sevillana folclórica y a Rosa, mi *verruquina* chistosa.

Gracias también a Jordi Alberch por aceptar ser tutor de esta tesis, y a Nuria Morante, por la paciencia y el buen humor que en todo momento tiene con los pobres becarios que estamos a punto de depositar la tesis. Muchas gracias!

A Jose M^o Palacios, muchas gracias por las ideas aportadas durante toda la etapa de tesis.

Gràcies també a la gent d'administració, a l'informàtic del centre, y a las que se encargan de mantener los laboratorios bien relucientes.

Pero no todo es ciencia en esta vida!

Morteh gràsieh als fotjos, Neus i Jaume, per estar al meu costat. Neus, muchísimas gracias por todos estos años de estudio, de ciencia y, sobretodo, de amistad que me has dedicado. Ostiesssssssss!!!

A Loli, cóndora voladora!!!! *Danke* por tu larga amistad, por esa biología de COU virtual y por las buenas experiencias vacacionales, pasadas y futuras. Muchas gracias por lanzarme ese cable!

Muchas gracias a Eva, VaneB, VaneO y Laia, por esas cenas de EGB tan divertidas que parece hemos conseguido estandarizar. A Laura y Montsheshí por esos momentos universitarios, a Izaskun por su amistad, y a Ruth por las charlas de este último año. Gracias!

Gracias también a los TOPOS: Stella, Neus-topo, Dani, Valle, Susana, Chema, Yolanda y Gemma por esas fiestas, cenas y cines varios. Y a un topo especial, Emilio, muchas gracias por los buenos momentos compartidos, por todo lo que me has dado y lo que he aprendido de ti en esa etapa Pinsu - *y no me niegues!*

A Ángeles y Xavi, muchas gracias pareja por esas bicicletadas, por esas risas y por estar ahí y a la "family" de Badalona, Esperanza, Emilio, Nuri y yaya María por todos estos años.

Muchas gracias a mis *laaaargasss* familias de Tarragona y de Arguedas, en especial a mi tío "Chato" (para ver si le entra en la cabeza que ya no trabajo con anchoas y que ahora trabajo con ratas), y a todos por estar siempre ahí, y enseñarme la piña que puede formar una familia. Muchas gracias!

Gracias mil a mi cuadrilla de Arguedas con los que he pasado muchísimos y buenos ratos desde hace *muuuchos* años, y con los que parece que no pasa el tiempo. En especial a Emi y Arancha, mis gemelicas, a Yugo y Cesar, Nuria y Pablo, Belén y Fran, Bea, Yuguico y Mondra. Muchas gracias!

Y para finalizar, pero no por ello menos importantes, me gustaría dar las gracias a mis padres, por educarme y apoyarme en todos mis proyectos y por quererme. A Rosana por enseñarme diferentes formas de ver las cosas, por su sentido de la vida y por estar siempre ahí para lo que necesite. A mi cuñado Marc, por esa predisposición a la comunicación que tanto admiro y a Paula, por todo lo que nos da sin saberlo y para que sepa en un futuro lo mucho que la quiero. Muchísimas gracias a todos!!!!



Science becomes what you want

Jan de Vente

ÍNDICE

ABREVIATURAS

INTRODUCCIÓN

| | |
|--|-----------|
| 1. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL | 4 |
| 2. AMPc | 4 |
| 2.1. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL AMPc | 5 |
| 2.1.1. Receptores de membrana acoplados a proteína G | 6 |
| 2.1.2. Proteína G | 7 |
| 2.1.3. Adenilato ciclasa | 8 |
| 2.1.4. Fosfodiesterasas | 10 |
| 2.1.5. Sistemas efectores del AMPc | 10 |
| 2.1.5.1. Proteína cinasa A | 11 |
| 2.1.5.2. CREB | 12 |
| 2.1.5.3. Factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) | 12 |
| 2.1.5.4. Canales iónicos dependientes de nucleótidos cíclicos | 13 |
| 2.1.5.5. Transportadores de nucleótidos cíclicos | 13 |
| 2.1.6. Compartimentalización de la señal del AMPc | 14 |
| 3. GMPc | 14 |
| 3.1. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL GMPc | 15 |
| 3.1.1. Óxido nítrico y óxido nítrico sintasa | 15 |
| 3.1.2. Guanilato ciclasa | 16 |
| 3.1.3. Fosfodiesterasas | 16 |
| 3.1.4. Sistemas efectores del GMPc | 17 |
| 3.1.4.1. Proteína cinasa G | 17 |
| 3.1.4.2. Canales iónicos dependientes de nucleótidos cíclicos | 17 |
| 3.1.4.3. Transportadores de nucleótidos cíclicos | 17 |
| 4. FOSFODIESTERASAS | 18 |
| 4.1. NOMENCLATURA Y CLASIFICACIÓN DE LAS PDE | 19 |
| 4.2. ESTRUCTURA MOLECULAR DE LAS PDE | 20 |
| 4.3. INHIBIDORES DE LAS PDE | 21 |
| 4.4. PDE1 | 22 |
| 4.5. PDE2 | 24 |
| 4.6. PDE3 | 26 |
| 4.7. PDE4 | 28 |
| 4.7.1. Estructura | 29 |
| 4.7.2. Regulación | 31 |
| 4.7.3. Compartimentalización intracelular | 36 |
| 4.7.4. Distribución tisular | 39 |
| 4.7.5. Ratones mutantes nulos de la PDE4 | 41 |
| 4.7.6. Inhibidores de la PDE4 | 42 |

| | |
|---|-----------|
| 4.7.7. Papel fisiológico de la PDE4 | 46 |
| 4.7.7.1. Efectos de la inhibición de la PDE4 en células inflamatorias | 47 |
| 4.7.7.2. Efectos de la inhibición de la PDE4 en enfermedades respiratorias | 49 |
| 4.7.7.3. Efectos antitumorales y antiangiogénicos de la inhibición de la PDE4 | 49 |
| 4.7.7.4. Papel en el sistema nervioso central | 50 |
| 4.8. PDE5 | 52 |
| 4.9. PDE6 | 54 |
| 4.10. PDE7 | 56 |
| 4.11. PDE8 | 58 |
| 4.12. PDE9 | 60 |
| 4.13. PDE10 | 62 |
| 4.14. PDE11 | 63 |
| 5. NEUROINFLAMACIÓN | 65 |
| 5.1 PRIVILEGIO INMUNE DEL SNC | 67 |
| 5.2 COMPONENTES CELULARES DE LA NEUROINFLAMACIÓN | 68 |
| 5.2.1. Células presentadoras de antígeno | 68 |
| 5.2.2. Microglía | 68 |
| 5.2.3. Astrogliá | 70 |
| 5.2.4. Células endoteliales | 71 |
| 5.2.5. Neuronas | 72 |
| 5.2.6. Células inflamatorias procedentes de sangre | 72 |
| 5.3 COMPONENTES HUMORALES DE LA NEUROINFLAMACIÓN | 73 |
| 5.3.1. Citocinas | 73 |
| 5.3.2. Quimiocinas (citocinas quimiotácticas) | 74 |
| 5.3.3. Formación de radicales y daño oxidativo | 75 |
| 5.3.4. Vías del ácido araquidónico | 75 |
| 6. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER | 76 |
| 7. MODELOS ANIMALES | 78 |
| 7.1. INFLAMACIÓN CON LIPOPOLISACÁRIDO | 78 |
| 7.2. ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL | 79 |
| <hr/> OBJETIVOS | 83 |
| <hr/> MÉTODOS | 87 |
| 1. OBTENCIÓN DE LOS TEJIDOS | 89 |
| 1.1. MODELOS ANIMALES UTILIZADOS | 89 |
| 1.2. PREPARACIÓN DEL TEJIDO | 90 |
| 2. TÉCNICAS Y MÉTODOS | 91 |
| 2.1. HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> | 91 |
| 2.1.1. HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> CON OLIGONUCLEÓTIDOS | 91 |
| 2.1.1.1. Sondas de DNA | 91 |
| 2.1.1.2. Hibridación <i>in situ</i> radiactiva | 93 |
| 2.1.1.3. Hibridación <i>in situ</i> no radiactiva | 95 |
| 2.1.1.4. Combinación de hibridación <i>in situ</i> radiactiva y no-radiactiva | 96 |

| | |
|---|-----|
| 2.1.2. HIBRIDACIÓN IN SITU CON RIBOSONDAS | 97 |
| 2.2. INMUNOHISTOQUÍMICA | 98 |
| 2.3. TINCIONES HISTOLÓGICAS | 100 |
| 2.4. ANÁLISIS DE DATOS | 101 |
| <hr/> | |
| RESULTADOS | |
| Trabajo 1: Neuronal expression of cAMP-specific phosphodiesterase 7B in the rat brain | 105 |
| Trabajo 2: Expression of the cGMP-specific phosphodiesterases 2 and 9 in normal and Alzheimer's disease human brains | 121 |
| Trabajo 3: Differential expression of PDE4B splice variants in rat brain and their regulation after systemic administration of LPS | 131 |
| Trabajo 4: Selective induction of cAMP phosphodiesterase PDE4B2 expression in experimental autoimmune encephalomyelitis | 141 |
| <hr/> | |
| DISCUSIÓN | 153 |
| <hr/> | |
| CONCLUSIONES | 167 |
| <hr/> | |
| BIBLIOGRAFÍA | 171 |

ABREVIATURAS

β_2 -AR Adrenoceptor β_2
 β ARK cinasa del Adrenoceptor β
5-HT serotonina
ABC *ATP-binding cassette*
ABP-280 *Actin-binding protein-280*
Ac anticuerpo
AC adenilato ciclasa
AINE antiinflamatorios no esteroideos
AKAP *A kinase anchoring protein*
AP área postrema
AP2 *adaptor protein 2*
APC célula presentadora de antígeno, *antigen presenting cells*
ARF6 *small G protein ADP-ribosylation factor 6*
ARNO *exchange factor ARF nucleotide binding site opener*
ATF-1 *activating transcription factor-1*
ATP adenosín trifosfato
BHE barrera hematoencefálica
CFA *Complete Freund's Adjuvant*
CNGC canal iónico dependiente de nucleótidos cíclicos, *cyclic nucleotide-gated channel*
COX ciclooxigenasa
CREB *cyclic AMP response element binding protein*
CREM *cyclic AMP response element modulator*
CREs *cyclic AMP response elements*
Csk *C-terminal Src kinase*
EAE encefalomiелitis autoinmune experimental
EDRF *endothelial-derived relaxing factor*
EGF factor de crecimiento epidérmico, *epidermal growth factor*
EHNA erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine
Epac *exchange protein directly activated by cAMP*
EPOC enfermedad pulmonar crónica obstructiva, COPD
ERK cinasa regulada por señales extracelulares, *extracellular kinase protein*
EST *Expressed Sequence TAG*
GAF sitios de unión no catalíticos específicos para GMPc
GCp guanilato ciclasa de membrana o particulada
GCs guanilato ciclasa soluble
GEF Factor intercambiador de nucleótidos de guanina de la superfamilia Ras
GFAP proteína ácida glial fibrilar
GPCR receptor acoplado a proteína G, *G-protein coupled receptor*
GRK *G-protein-coupled receptor kinase*
GTP guanidín trifosfato
HARBS *high-affinity rolipram binding sites*
HLA *human leukocyte antigen*
HPAA *hypothalamus pituitary adrenal axis*
ICAM-1 *intercellular adhesion molecule-1*
IFA *Incomplete Freund's Adjuvant*
IFN- α interferón alpha
IFN- γ interferón gamma
IP-3K cinasa IP-3
ITAM *immunotyrosine-based activation motive*
JAK cinasa Janus, *Janus Kinases*
JAM-1 *junctional adhesion molecule-1*
KO *knockout*

LARBS *low-affinity rolipram binding sites*
Lck cinasa de la familia Src
LPS lipopolisacárido
LTD *long term depression*
LTP *long term potentiation*
mAKAP *muscle-selective A-kinase anchoring protein*
MAPK cinasa de la proteína activada por mitógenos, *mitogen activated protein kinase*
MBP *myeline binding protein*
ME eminencia media
MHC *major histocompatibility complex*
MOG *myeline oligodendrocyte glicoproteine*
MRP4 *multidrug resistance protein 4*
MRP5 *multidrug resistance protein 5*
NAP péptido natriurético atrial, *natriuretic atrial peptide*
NGF factor de crecimiento neuronal, *nerve growth factor*
NO óxido nítrico
NOS óxido nítrico sintasa
NSF *N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein*
OVTL órgano vasculoso de la lámina terminal
PA ácido fosfatídico
PAMP *pathogen-associated molecular patterns*
PAS proteínas *Per*, *ARNT* y *Sim*
PCAM-1 *platelet/endothelial cell adhesion molecule-1*
PDE fosfodiesterasa
PGE1 prostaglandina E1
PKA protein cinasa dependiente de AMPc, *cAMP-dependent kinase*
PKG proteína cinasa G, *cGMP-dependent kinase*
PLA2 fosfolipasa A2
PLC fosfolipasa C
RACK1 *receptor for activated c-kinase*
Rap1 *Ras-like GTPase* pequeña
Ras proteína pequeña de unión a GTP
REC *receiver domain*
RNS especies reactivas de nitrógeno
ROS especies reactivas de oxígeno
SFO órgano subfornical
SH3 SRC homology 3
siRNA *small inhibitory RNA*
TCR receptor de célula T
TLR *toll-like receptor*
UCR1, UCR2 *upstream conserved region*
VCAM *vascular cell adhesion molecule*