

Picking the best isoform

Citation for published version (APA):

Paes, D. (2023). Picking the best isoform: PDE4D isoforms as therapeutic targets in Alzheimer's disease. [Doctoral Thesis, Maastricht University, Hasselt University/tUL]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20231117dp>

Document status and date:

Published: 01/01/2023

DOI:

[10.26481/dis.20231117dp](https://doi.org/10.26481/dis.20231117dp)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

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

[Link to publication](#)

General rights

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

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

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

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

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

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Chapter 8

Summary

The goals of this thesis were 1) to identify which PDE4D isoforms are involved in neuroplasticity processes that are impaired by AD-associated pathology, and 2) to investigate the therapeutic potential of using combined treatments to reduce the therapeutic dose of PDE4(D) inhibitors. In light of these goals, this thesis presents a comprehensive literature review and four experimental studies using *in silico*, *in vitro*, and *in vivo* approaches.

In order to identify which PDE4D isoforms are involved in neuroplasticity processes that are impaired by AD-associated pathology, an extensive overview was established on the molecular biology of PDE4 enzymes and their utility as pharmacological targets in **Chapter 2**. It was outlined that PDE4 enzymes are encoded by four different genes (*PDE4A-D*) that each give rise to multiple isoforms owing to the use of alternative promoters and alternative splicing. Confusion can arise when referring to these isoforms as their nomenclature may differ across online databases, species and depending on whether one refers to the isoform's mRNA or protein. Hence, an overview figure of all known isoforms (page 41) and a comparison of human and rodent isoforms (page 126) were established to clarify the nomenclature and classification to the scientific field and to easily refer to the multitude of isoforms in upcoming chapters. This chapter also summarized how differences in protein sequence across PDE4 subtypes and isoforms result in different properties in view of enzymatic activity regulation, protein-protein interactions and inhibitor binding by changing the enzyme's conformation. The amino acids involved in all reported post-translational modifications and interactions with other proteins were illustrated in an overview figure (page 51). Moreover, the effect of these modifications and interactions on enzymatic activity of PDE4 subtypes or isoforms and their affinity to PDE4 inhibitors was reported. This overview provided the rationale to establish a thorough analysis of the approaches to determine affinities of PDE4 inhibitors. Therefore, a comprehensive list of PDE4 inhibitors was compiled indicating affinity per PDE4 subtype (page 69), isoform (page 75) or conformation

(page 79). Lastly, potential mechanisms underlying the adverse side effects associated with PDE4 inhibition were described in relation to the therapeutic dose ranges of several PDE4 inhibitors.

Next, using the gained knowledge on human PDE4D isoform sequences, promoter DNA (hydroxy)methylation and mRNA expression of PDE4D isoforms were measured in post-mortem material of the middle temporal lobe of AD patients and healthy controls (**Chapter 3**). Specific isoforms (PDE4D1, -D3, -D5, and -D8) displaying increased expression in AD were identified, concomitant with changes in the DNA methylation signatures of associated promoter regions. Moreover, increased PDE4D1 and PDE4D3 expression was associated with higher levels of plaque and tangles and lower cognitive performance. This study indicated that, although stemming from the same gene, expression regulation of PDE4D is impacted in an isoform-specific manner in AD.

To follow up on and complement these findings using human material, studies using animal models and cell lines were conducted in **Chapter 4**. In correspondence to the observations in human tissue, an upregulation of the same PDE4D isoforms was found in brain material of transgenic AD mice that exhibit amyloid- β pathology as well as in cultured hippocampal neurons exposed to amyloid- β . The notion that pharmacological PDE4D inhibition can promote neuronal plasticity was validated in the same mouse hippocampal neuronal cell line. Making use of CRISPR-Cas9 mediated gene-editing, it was determined in the same cell line that specific knockdown of one of the long PDE4D isoforms (i.e. PDE4D3, PDE4D5, PDE4D7, and PDE4D9) is sufficient to enhance neuronal plasticity processes. Moreover, knockdown of one of these isoforms could protect against plasticity-impairing effect of amyloid- β . Lastly, this chapter indicated which of the long PDE4D isoforms may not be involved in stomach-associated side effects of PDE4(D) inhibition by describing the isoform-specific expression in the mouse stomach.

Since knockdown of long-form PDE4D isoforms specifically was found to promote neuronal plasticity, the understanding of the molecular biology of the different PDE4D isoforms described in **Chapter 2** could be used to put these findings into a mechanistic perspective. The enzyme activity of PDE4D isoforms is differentially altered by phosphorylation by protein kinase A (PKA) and/or extracellular signal-regulated kinase (ERK) depending on the isoform category (i.e. long, short, and supershort). In order to understand why genetic knockdown of long isoforms specifically enhanced neuronal plasticity, an *in silico* computational model was established to simulate how the different isoform categories regulate cyclic adenosine monophosphate (cAMP) levels and control downstream signaling over time (**Chapter 5**). Here, it was described that long PDE4D isoforms specifically exert the largest control on cAMP and its downstream signaling. Hence, supporting the experimental data of the previous chapter, inhibition of long PDE4D isoforms may provide the most profound approach to increase cAMP signaling involved in neuronal plasticity processes.

In view of the first goal of this thesis, inhibition of specific PDE4D isoforms involved in (AD-associated) memory processes could provide a more efficacious and/or safer therapeutic strategy. Besides this approach, the safety of PDE4(D) inhibitors can be improved by lowering the required therapeutic dose to reduce the risk of adverse side effects. Following up on the second goal of this thesis, **Chapter 6** demonstrates the potential of combining PDE2 and PDE4 inhibitors to promote neuroplasticity *in vitro* and stimulate memory consolidation *in vivo*. As it was found that PDE2 and PDE4 inhibitors exert synergistic actions, the therapeutic doses of each inhibitor could be lowered, which would minimize the risk of PDE4-mediated adverse side effects.

Concludingly, the work in this thesis has established the potential of PDE4D isoform-specific inhibition and synergistic PDE4/PDE2 inhibition as new strategies to

make PDE4-targeting therapies more efficacious and/or safer for the benefit of treating memory deficits in AD.

Chapter 9

Samenvatting

De doelstellingen van deze thesis waren 1) het identificeren welke PDE4D-isovormen betrokken zijn bij de processen van neuroplasticiteit die door AD-gerelateerde pathologie aangedaan worden, en 2) het onderzoeken van het therapeutische potentieel van gecombineerde behandelingen gericht op het verlagen van de therapeutische dosis van PDE4(D)-inhibitoren. In het kader van deze doelstellingen worden in deze thesis een uitgebreide literatuurreview uiteengezet, alsmede vier experimentele studies waarin gebruik is gemaakt van *in silico*, *in vitro* en *in vivo*-methoden.

Om te kunnen identificeren welke PDE4D-isovormen betrokken zijn bij de processen van neuroplasticiteit die aangetast worden door AD-gerelateerde pathologie, wordt in **Hoofdstuk 2** een uitgebreid overzicht gepresenteerd die de moleculaire biologie van PDE4-enzymen uiteenzet en het potentieel van deze enzymen als effectief farmacologisch doelwit. In dit hoofdstuk wordt beschreven dat PDE4-enzymen door vier verschillende genen worden gecodeerd (*PDE4A-D*) die elk, door middel van alternatieve promoters en alternatieve splicing, meerdere isovormen tot expressie kunnen brengen. Bij het refereren naar deze isovormen kan er onduidelijkheid ontstaan doordat er verschillen bestaan in de gebruikte nomenclatuur binnen online databases, binnen diersoorten en of er wordt gerefereerd naar het mRNA of het eiwit van de isoform. Derhalve is een overzicht van alle tot dusver bekende isovormen samengesteld (pagina 41) samen met een vergelijking van humane isovormen en isovormen bij knaagdieren (pagina 126) ter verduidelijking van de nomenclatuur en classificatie voor het wetenschappelijke veld en om makkelijker te kunnen refereren naar de veelvuldige isovormen in de volgende hoofdstukken. In dit hoofdstuk wordt ook samengevat hoe verschillen in eiwitsequentie tussen PDE4-subtypen en -isovormen leiden tot verschillende eigenschappen met betrekking tot regulatie van enzymactiviteit, eiwit-eiwitinteracties en het binden van inhibitoren door veranderingen in de conformatie van het enzym. Welke aminozuren betrokken zijn bij alle in de literatuur beschreven

post-translationele modificaties en interacties met andere eiwitten is weergegeven in de figuur op pagina 51. Eveneens wordt het effect van deze modificaties en interacties op enzymatische activiteit van PDE4-subtypen of -isovormen en PDE4-inhibitoraffiniteit beschreven. Dit overzicht heeft de aanleiding gevormd om een grondige analyse uit te voeren naar de wijze waarop de affiniteit van een PDE4-inhibitor wordt bepaald. Daartoe is een uitgebreid overzicht van PDE4-inhibitoren samengesteld waarbij affiniteit wordt weergegeven per PDE4-subtype (pagina 69), isovorm (pagina 75) en conformatie (pagina 79). Tenslotte worden de potentiële onderliggende mechanismen beschreven die geassocieerd worden met de negatieve bijwerkingen door PDE4-inhibitie en hoe deze zich verhouden tot therapeutische doses van verscheidene PDE4-inhibitoren.

Vervolgens, gebruikmakend van de opgedane inzichten omtrent humane PDE4D isovorm sequenties, werden promotor DNA (hydroxy)methylatie en mRNA expressie van PDE4D isovormen gemeten in post-mortem hersenmateriaal van de middelste slaapwending van AD patiënten en gezonde controles (**Hoofdstuk 3**). Specifieke isovormen (PDE4D1, -D3, -D5 en -D8) werden geïdentificeerd die een verhoogde expressie in AD lieten zien, welke geassocieerd was met veranderingen in het DNA methylatieprofiel van de corresponderende promotor-regio's. Bovendien was verhoogde PDE4D1 en PDE4D3 expressie geassocieerd met verhoogde niveaus van amyloïde plaques en neurofibrillaire tangles en een lager cognitief vermogen. Deze studie toonde aan dat, hoewel isovormen voortkomen uit hetzelfde gen, expressieregulatie van PDE4D in AD wordt beïnvloed op een isovorm-specifieke wijze.

Om voort te borduren op de gedane bevindingen in humaan materiaal en deze bevindingen aan te vullen werden er in **Hoofdstuk 4** experimenten verricht gebruikmakend van diermodellen en cellijnen. In overeenstemming met de observaties in human weefsel werd er een expressieverhoging van dezelfde PDE4D isovormen gevonden in hersenmateriaal van transgene AD muizen die β -amyloïd

pathologie vertonen alsmede in gekweekte hippocampale neuronen blootgesteld aan β -amyloïd. Het idee dat farmacologische inhibitie van PDE4D neuronale plasticiteit kan bevorderen werd gevalideerd in dezelfde murine hippocampale neuroncellijn. Gebruikmakend van CRISPR-Cas9 gemedieerde genbewerking werd in dezelfde cellijn bepaald dat specifieke knock-down van één van de lange PDE4D isovormen (i.e. PDE4D3, PDE4D5, PDE4D7 en PDE4D9) voldoende is om neuronale plasticiteitsprocessen te verbeteren. Bovendien kon knock-down van één van deze isovormen bescherming verschaffen tegen het plasticiteit-aantastende effect van β -amyloïd. Ten slotte gaf dit hoofdstuk, door het beschrijven van isovorm-specifieke expressie in de muizenmaag, aan welke van de lange PDE4D isovormen wellicht niet betrokken zijn bij het induceren van maag-geassocieerde bijwerkingen van PDE4(D) inhibitie.

Aangezien het werd gevonden dat knock-down van lange PDE4D isovormen neuronale plasticiteit bevordert, kon het inzicht in de moleculaire biologie van de verschillende PDE4D isovormen zoals beschreven in **Hoofdstuk 2** gebruikt worden om deze bevindingen in een mechanistisch perspectief te plaatsen. De enzymactiviteit van PDE4D isovormen wordt differentieel beïnvloed door fosforylering door 'proteïn kinase A' (PKA) en/of 'extracellulair signaal-regulerende kinase' (ERK) afhankelijk van de isovorm-categorie (i.e. lang, kort en superkort). Om te begrijpen waarom genetische knock-down van specifiek lange isovormen neuronale plasticiteit bevorderde, werd er een *in silico* computationeel model gecreëerd om te simuleren hoe de verschillende isovorm-categorieën cyclisch adenosine monofosfaat (cAMP) niveaus reguleren en hoe deze de vervolgsignalering beïnvloeden gedurende de tijd (**Hoofdstuk 5**). In dit hoofdstuk werd beschreven dat specifiek lange PDE4D isovormen het grootste effect uitoefenen op cAMP signalering en de signalering die daarop volgt. De experimentele data uit het vorige hoofdstuk wordt hierdoor ondersteund en daardoor kan gesuggereerd worden dat

inhibitie van lange PDE4D isovormen de meest effectieve aanpak is om de cAMP signalering die betrokken is in neuronale plasticiteitsprocessen te bevorderen.

Betreffende de eerste doelstelling van deze thesis kan inhibitie van specifieke PDE4D isovormen betrokken bij (AD-geassocieerde) geheugenprocessen een effectievere en/of veiligere behandelstrategie verschaffen. Naast deze aanpak kan de veiligheid van PDE4(D) inhibitoren ook verbeterd worden door het verlagen van de therapeutische dosis om het risico op nadelige bijwerkingen te reduceren. In lijn met de tweede doelstelling van deze thesis, laat **Hoofdstuk 6** het potentieel zien van het combineren van PDE2 en PDE4 inhibitoren om neuroplasticiteit *in vitro* en geheugenvorming *in vivo* te stimuleren. Aangezien werd bevonden dat PDE2 en PDE4 synergistische acties vertonen, zouden therapeutische doses van iedere inhibitor verlaagd kunnen worden wat er vervolgens voor zou kunnen zorgen dat het risico op PDE4-gemedieerde nadelige bijwerkingen geminimaliseerd wordt.

Concluderend, het werk in deze thesis heeft de potentie van PDE4D isovorm-specifieke inhibitie en synergistische PDE4/PDE2 inhibitie vastgesteld als nieuwe strategieën om behandelingen gericht op PDE4 doeltreffender en/of veiliger te maken ten bate van de behandeling van geheugenproblemen in AD.