

Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

MARIANA FERREIRA BIZZI

**A EXPRESSÃO DE FOSFODIESTERASES DA FAMÍLIA 4A
EM ADENOMAS HIPOFISÁRIOS ESPORÁDICOS E EM
ADENOMAS HIPOFISÁRIOS COM DIFERENTES
MUTAÇÕES DO GENE QUE CODIFICA A PROTEÍNA DE
INTERAÇÃO COM O RECEPTOR ARIL HIDROCARBONO
(AIP)**

Belo Horizonte

2015

Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

MARIANA FERREIRA BIZZI

**A EXPRESSÃO DE FOSFODIESTERASES DA FAMÍLIA 4A
EM ADENOMAS HIPOFISÁRIOS ESPORÁDICOS E EM
ADENOMAS HIPOFISÁRIOS COM DIFERENTES
MUTAÇÕES DO GENE QUE CODIFICA A PROTEÍNA DE
INTERAÇÃO COM O RECEPTOR ARIL HIDROCARBONO
(AIP)**

Versão Final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Neurociências da Universidade Federal de Minas
Gerais para a obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Antônio Ribeiro de Oliveira Júnior

Belo Horizonte

2015

043 Bizzi, Mariana Ferreira.

A expressão de fosfodiesterases da família 4A em adenomas hipofisários esporádicos e em adenomas hipofisários com diferentes mutações do gene que codifica a proteína de interação com o receptor aril hidrocarbono (AIP) [manuscrito] / Mariana Ferreira Bizzi. – 2015.

80 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Antonio Ribeiro de Oliveira Junior.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

1. Neurociências. 2. Diester Fosfórico Hidrolases. 3. AMP cíclico. 4. Adenoma. 5. Hipófise. I. Oliveira Júnior, Antonio Ribeiro de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

A EXPRESSÃO DE FOSFODIESTERASES DA FAMÍLIA 4A EM ADENOMAS HIPOFISÁRIOS ESPORÁDICOS E EM ADENOMAS HIPOFISÁRIOS COM MUTAÇÃO DO GENE QUE CODIFICA A PROTEÍNA DE INTERAÇÃO COM O RECEPTOR ARIL HIDROCARBONO (AIP)

MARIANA FERREIRA BIZZI

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em NEUROCIÊNCIAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em NEUROCIÊNCIAS, área de concentração NEUROCIÊNCIAS BÁSICAS.

Aprovada em 29 de junho de 2015, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Antônio Ribeiro de Oliveira Junior - Orientador
UFMG

Prof(a). Sergio Veloso Brant Pinheiro
UFMG

Prof(a). Alexandre Varella Giannetti
Faculdade de Medicina da UFMG

Belo Horizonte, 29 de junho de 2015.

Reitor: Professor Jaime Arturo Ramírez

Pró-reitores de pós-graduação: Professor Rodrigo Antônio de Paiva Duarte e Professor Humberto Stumpf

Diretora do Instituto de Ciências Biológicas: Professora Andrea Mara Macedo

Coordenadora do curso de pós-graduação em Neurociências: Professora Carmen Elvira Flores-Mendoza Prado

Local de realização: Laboratório de Pesquisa em Endocrinologia – Faculdade de Medicina - UFMG

Orientador: Prof. Dr. Antônio Ribeiro de Oliveira Júnior

Agências financiadoras: CAPES, FAPEMIG, CNPq

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer ao meu orientador Toninho pela confiança e oportunidade de desenvolver esse projeto. Sua competência, exemplo e amizade durante toda essa trajetória foram fundamentais para meu crescimento profissional e pessoal.

Em especial a Professora Marta Korbonits e ao Professor Graeme Bolger cujo apoio científico experimental através da disponibilização de lâminas histológicas, anticorpos para PDE4A4 / PDE4A8 e amplas discussões sobre o tema desse estudo, foram de grande importância e sem eles esse trabalho não seria possível!

Ao Professor Sérgio Veloso Brant Pinheiro por toda a ajuda, discussões e ensinamentos das técnicas.

Ao Professor Eduardo Paulino e à Professora Lúcia Porto pelo profissionalismo e disponibilidade em ajudar e ensinar.

À Professora Ana Lúcia Cândido por seu carinho, apoio e estímulo à pesquisa e busca pelo conhecimento.

Aos meus amigos e familiares pela compreensão durante toda a trajetória.

Aos colegas do laboratório pela ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço ao apoio incondicional da minha família. Especialmente ao Thiago e minha filha Beatriz, companheiros sem igual, que sempre me estimulam a realizar meus sonhos e compreendem minha ausência. À minha Mãe Marta e ao meu irmão Gabriel por me apoiarem e ensinarem a superar desafios.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
RESUMO	XII
ABSTRACT.....	XIV
INTRODUÇÃO	1
A Glândula Hipófise.....	2
Tumores Hipofisários.....	3
A Via do AMP cíclico - cAMP	4
As Fosfodiesterases – PDEs.....	7
AIP – Proteína de interação com receptor aril hidrocarbono	13
OBJETIVOS	18
Objetivo Geral.....	19
MATERIAIS E MÉTODOS	20
Considerações éticas	21
Grupos de Estudo	21
Amostras	22
Anticorpos	22
Imunofluorescência.....	24
Análise das Imagens.....	26
Análise Estatística	27
RESULTADOS.....	28
Expressão de PDE4A4 na hipófise normal versus adenomas hipofisários	29
Expressão de PDE4A8 na hipófise normal versus adenomas hipofisários	32
Expressão de PDE4A4 em amostras de adenomas hipofisários secretores de GH com mutação AIP	35

Expressão de PDE4A8 em amostras de adenomas hipofisários secretores de GH com mutação AIP	38
DISCUSSÃO.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ANEXO I	56
Carta de Aprovação do Comitê de Ética	57
Carta de Aprovação do Comitê de Ética	58
ANEXO II	59
Artigos submetidos e aceitos para publicação	

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico

AhR – Receptor aril hidrocarbono

AIP – Proteína de interação com receptor aril hidrocarbono

ARA9 – Clone com a proteína AIP

cAMP – Segundo mensageiro AMP cíclico

FIPA – Familiar isolated pituitary adenoma

FSH – Hormônio folículo estimulante

GH – Hormônio do crescimento

LH – Hormônio luteinizante

LOH – Perda de heterozigose

NEM – Neoplasias endócrinas múltiplas

PDE – Fosfodiesterase

PKA – Proteína Quinase A

PRL – Prolactina

TSH – Hormônio tireo-estimulante

UCR – *Upstream conserved region*

XAP2 – *X-protein Associated Protein 2*

XRE – *Xenobiotic Regulatory Enhancer*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	6
Figura 2	8
Figura 3	11
Figura 4	12
Figura 5	13
Figura 6	16
Figura 7	23
Figura 8	30
Figura 9	33
Figura 10	36
Figura 11	39
Figura 12	44
Figura 13	48

RESUMO

As fosfodiesterases humanas (PDEs) compreendem uma complexa super família de enzimas derivadas de 21 genes e separadas em onze isoformas (PDE 1 - 11), difundidas nos diferentes tecidos e células, incluindo coração e cérebro. As isoformas PDE 4, 7 e 8 são específicas para a cAMP. Esse segundo mensageiro é responsável pela mediação de diversas ações fisiológicas, envolvendo diferentes hormônios e neurotransmissores. A via cAMP desempenha um importante papel no desenvolvimento e função dos tecidos endócrinos. Já as fosfodiesterases são responsáveis por assegurar a adequada intensidade das ações dessa via, uma vez que são enzimas responsáveis pela hidrólise de cAMP em sua forma inativa 5'-AMP. O objetivo desse trabalho é estudar a expressão de fosfodiesterases da família 4A em adenomas hipofisários esporádicos e em adenomas hipofisários com diferentes mutações do gene que codifica a proteína de interação com o receptor aril hidrocarbono (AIP). Foram incluídos no estudo, cortes de amostras em blocos de parafina obtidas através de biópsias de adenomas hipofisários, sem mutação do AIP, representativos de cada um dos principais subtipos de adenomas: secretores de hormônio do crescimento (GH); secretores de prolactina (PRL); secretores de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH); adenomas clinicamente não funcionantes positivos para FSH (NFPAs). Também foram incluídas amostras de adenomas secretores de hormônio do crescimento (GH) com mutação AIP (Q164X, INS274, R304X, R304Q, Glu2228, Unusual) e hipófises normais. Os cortes foram duplamente marcados pela técnica de imunofluorescência para a co-localização de PDE4A nos diferentes tipos celulares da hipófise, a leitura das lâminas foi realizada em microscopia de confocal e as imagens analisadas pelo software ImageJ. Ambas as isoformas de PDE4A analisadas nesse estudo são presentes nos diferentes tipos celulares constituintes da hipófise humana. O padrão de expressão dessas PDEs variaram de

acordo com o tipo celular, sendo que para PDE4A4 a expressão em células hipofisárias normais secretoras de GH e FSH foi maior do que em células secretoras de ACTH e PRL. Já para PDE4A8, a expressão foi maior em células secretoras de PRL, GH e FSH. Entretanto, independente da isoforma de PDE4A a expressão de PDE é aumentada em todos os adenomas hipofisários esporádicos ($P < 0,0001$). Já nas amostras de tumores secretores de GH com mutações do gene AIP a expressão das PDEs varia dependendo da mutação. Esses dados sugerem pela primeira vez que as duas isoformas apresentadas nesse estudo estão expressas no tecido da hipófise humana normal; que a expressão aumentada de PDEs em adenomas hipofisários esporádicos possa ser uma resposta compensatória à tumorigênese; e que a expressão de PDEs em tumores hipofisários é interrompida por várias mutações AIP, sugerindo um papel putativo desta isoforma na tumorigênese hipofisária, e possivelmente contribuindo para a perda de função do AIP.

ABSTRACT

Human phosphodiesterases (PDEs) comprise a complex superfamily of enzymes derived from 21 genes separated into 11 PDE gene families (PDEs 1-11), diffused in different tissues and cells, including heart and brain. The isoforms PDE 4, 7 and 8 are specific for cAMP. This second messenger is responsible for mediating diverse physiological actions involving different hormones and neurotransmitters. The cAMP pathway play an important role in development and function of endocrine tissues. Already phosphodiesterases are responsible for ensuring the appropriate intensity of the actions of this pathway, as they are enzymes responsible for hydrolysis of cAMP in its inactive form 5'-AMP. The objective of this work is to study the expression of phosphodiesterase 4A family in sporadic pituitary adenomas and pituitary adenomas with different mutations of the gene encoding the aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP). Paraffin sections samples obtained by pituitary adenomas biopsies without mutation the AIP, representing each of the principal subtypes of adenomas: GH-secreting tumour; PRL-secreting tumour; ACTH-secreting tumour and non-functioning pituitary tumour positive for FSH (NFPAs) were included in the study. Also included samples of GH-secreting tumours with AIP mutation (Q164X, INS274, R304X, R304Q, Glu2228, Unusual) and normal pituitary. The samples were subjected to the double immunofluorescent staining for co-location PDE4A in different cell types of pituitary. The analysis were in confocal microscopy and the images analyzed by ImageJ software. Both PDE4A isoforms analyzed in this study are present in different cellular types of human pituitary. The expression pattern of these PDEs varied according to cell type. PDE4A4 expression was higher in GH and FSH normal pituitary cells while for PDE4A8, the expression was higher in the normal PRL, GH and FSH pituitary cells.

However, independent of the isoform of PDE4A, the expression is increased in all sporadic pituitary adenomas ($P < 0.0001$). In the GH-secreting tumors with AIP mutation the expression of PDEs varies depending upon the mutation. These data suggest for the first time that both isoforms presented in this study are expressed in the tissue from human normal pituitary; the increased expression of PDEs in sporadic pituitary adenomas may be a compensatory response to tumorigenesis; and PDEs expression in pituitary tumors is interrupted by several AIP mutations, suggesting a putative role of this isoform in pituitary tumorigenesis, and possibly contributing to the loss of AIP function.

INTRODUÇÃO

A Glândula Hipófise

A hipófise está anatomicamente localizada no osso esfenóide, mais precisamente na sela túrcica. Dentre as demais glândulas endócrinas, a hipófise possui fundamental importância por estar envolvida no controle de diversos processos, tais como: crescimento, desenvolvimento e reprodução do indivíduo, equilíbrio metabólico, entre outras funções. Isso ocorre via produção e secreção de seis hormônios: de crescimento – GH (células hipofisárias do tipo somatotrofo), tireo-estimulante – TSH (tireotrofo), adrenocorticotrófico – ACTH (corticotrofo), prolactina – PRL (lactotrofo), luteinizante – LH e folículo estimulante – FSH (gonadotrofo).

Essa glândula endócrina é dividida em lóbulo anterior (adenohipófise) e lóbulo posterior (neurohipófise). As células da adenohipófise são as responsáveis pela produção e secreção de GH, TSH, ACTH, PRL, LH e FSH, enquanto que a neurohipófise não produz nenhum hormônio e é apenas responsável por armazenar e secretar hormônios sintetizados pelo hipotálamo (oxitocina e hormônio antidiurético – ADH). O sistema de sinalização hipotalâmica é uma importante diferença entre a adeno e a neurohipófise. O hipotálamo é composto por neurônios longos que se estendem até a neurohipófise, onde secretam diretamente hormônios e neurotransmissores. Em contrapartida, a comunicação hipotálamo-adenohipófise ocorre através de um plexo vascular, o sistema porta hipotálamo-hipófise. Primeiramente núcleos específicos do hipotálamo secretam seus hormônios na eminência medial. Esses hormônios hipotalâmicos são transportados pelos vasos do sistema porta hipotálamo-hipófise até a adenohipófise, onde cada tipo de célula hipofisária (somatotrofo, tireotrofo, corticotrofo, lactotrofo e gonadotrofo) expressa receptores hormonais específicos (GH-R, TSH-R, ACTH-R, PRL-R, LH-R e FSH-R). Sendo assim, podemos dizer que o hipotálamo regula o funcionamento da adenohipófise de uma forma bem específica. (1)

Tumores Hipofisários

A grande maioria dos tumores hipofisários apresenta ocorrência esporádica, porém tumores hipofisários familiares podem ocorrer associados a síndromes envolvendo outras glândulas endócrinas (neoplasias endócrinas múltiplas – NEM – e complexo de Carney) ou em casos onde a doença envolve somente a glândula hipófise (predisposição familiar a adenomas hipofisários – FIPA) (2).

Apesar de representarem 5% do total dos tumores esporádicos em geral, estudos para a descoberta de genes associados à tumorigênese endócrina em tumores hipofisários familiares podem ser importantes (3).

Os tumores hipofisários geralmente apresentam hipersecreção dos hormônios hipofisários e são denominados de acordo com o hormônio produzido: tumores secretores de GH (somatotropinomas), secretores de PRL (prolactinomas), secretores de ACTH (corticotropinomas), secretores de TSH (tireotropinomas, secretores de gonadotropinas (gonadotropinomas, LH ou FSH) e co-secretores. Existem também os tumores hipofisários não funcionantes ou não secretores (NFPAs), que são assim chamados por não produzirem síndromes clínicas de hipersecreção hormonal. Os adenomas hipofisários também podem ser classificados quanto ao seu tamanho: microadenomas (< 1 cm) e macroadenomas (> 1 cm). A idade média de diagnóstico é de 30-40 anos para tumores esporádicos enquanto que nos casos com histórico familiar esse diagnóstico tende a ser feito mais precocemente, abaixo dos 30 anos (3).

Estima-se que aproximadamente 10% da população apresente anomalias hipofisárias compatíveis com adenomas silenciosos. A prevalência de incidentalomas de hipófise diagnosticados por imagem varia de 3,7 a 20% (4). Séries de autópsias revelaram que 6 a 22% dos indivíduos investigados possuíam massas hipofisárias compatíveis com tumores (5).

Dados epidemiológicos indicam que a prevalência dos tumores hipofisários sintomáticos é cerca de 1/1.000 (3), sendo que os prolactinomas são os os adenomas com maior prevalência (40 a 50%), seguidos pelos adenomas clinicamente não funcionantes (35%), somatotropinomas (acromegalia – 10 a 20%) e corticotrofinomas (5 a 10%). Já os gonadotrofinomas / tireotropinomas são considerados raros (6-8).

A Via do AMP cíclico - cAMP

A hipófise é uma glândula alvo de diferentes neuro hormônios, que possui função crucial no controle da diferenciação / proliferação celular além da secreção hormonal através do reconhecimento específico da super família de receptores acoplados à proteína G (GPCR) (9, 10).

Após secretado, o hormônio estimulante acopla-se a proteína G na célula de interesse e ocorre uma alteração conformacional. A subunidade G_{α} é liberada do complexo e liga-se a adenil-ciclase, que catalisa então a conversão de ATP no segundo mensageiro 3',5' monofosfato cíclico (cAMP). Esse composto ativa uma cascata de outras enzimas, amplificando assim a reação celular (11).

O segundo mensageiro – cAMP – está envolvido na regulação de diversas funções celulares relacionadas com a fosforilação da proteína através da ativação da Proteína quinase A (PKA) (9, 11). A elevação nos níveis de cAMP intracelular leva a dissociação da subunidade catalítica da subunidade reguladora da PKA. Essa proteína quando ativada pode então fosforilar uma série de alvos que regulam enzimas efetoras, canais de íons, e ativa a transcrição de genes específicos que medeiam o crescimento e diferenciação celular (Figura1). As fosfodiesterases são reguladoras da via do cAMP, visto que são capazes de hidrolisar o cAMP para sua forma inativa 5'-AMP, principal

via para a inativação de cAMP para assegurar a adequada intensidade das ações dessa via (12).

À medida que o efeito afeta a proliferação celular, cAMP pode ou não influenciar, deter ou até mesmo suprimir a ação mitogênica de fatores de crescimento em algumas linhagens de células ou, inversamente, promover a transição de G0 para G1 e estimular o crescimento celular em outras (13, 14).

Ainda não se sabe por que a cascata de cAMP pode ter tanto um papel proliferativo em algumas células (linhagem somatotrófica) ou antiproliferativo em outras (linhagem gonadotrófica) (9).

A via de cAMP desempenha um papel importante no desenvolvimento e função dos tecidos endócrinos. Qualquer alteração nessa via provoca inúmeros distúrbios no sistema endócrino. Diversas mutações genéticas da via de sinalização do cAMP estão descritas na literatura. Como exemplo podemos citar mutações de ativação do gene que codifica para o receptor de TSH (TSHR) em adenomas tóxicos de tireóide (15) e do receptor de cálcio na hipocalcemia familiar (16). Pode-se citar também a síndrome de McCune-Albright (17) e adenomas hipofisários esporádicos (secretores de GH) (18) nos quais é descrita uma mutação estimulatória da subunidade α da proteína Gs. Mutações na via do cAMP também são descritas no complexo de Carney (conhecido por predispor à neoplasias de tireóide, hipófise, adrenais e testículos), no qual já foram descritas mutações inativadoras do PRKAR1A, responsável por codificar a subunidade regulatória 1 da proteína quinase dependente de cAMP - A (PKA) (19).

As fosfodiesterases desempenham importante papel regulador na via do cAMP e da guanosina monofosfato cíclica (cGMP), através da inativação por hidrólise de cAMP em 5' AMP ou de cGMP em 5' GMP (dependendo da PDE envolvida).

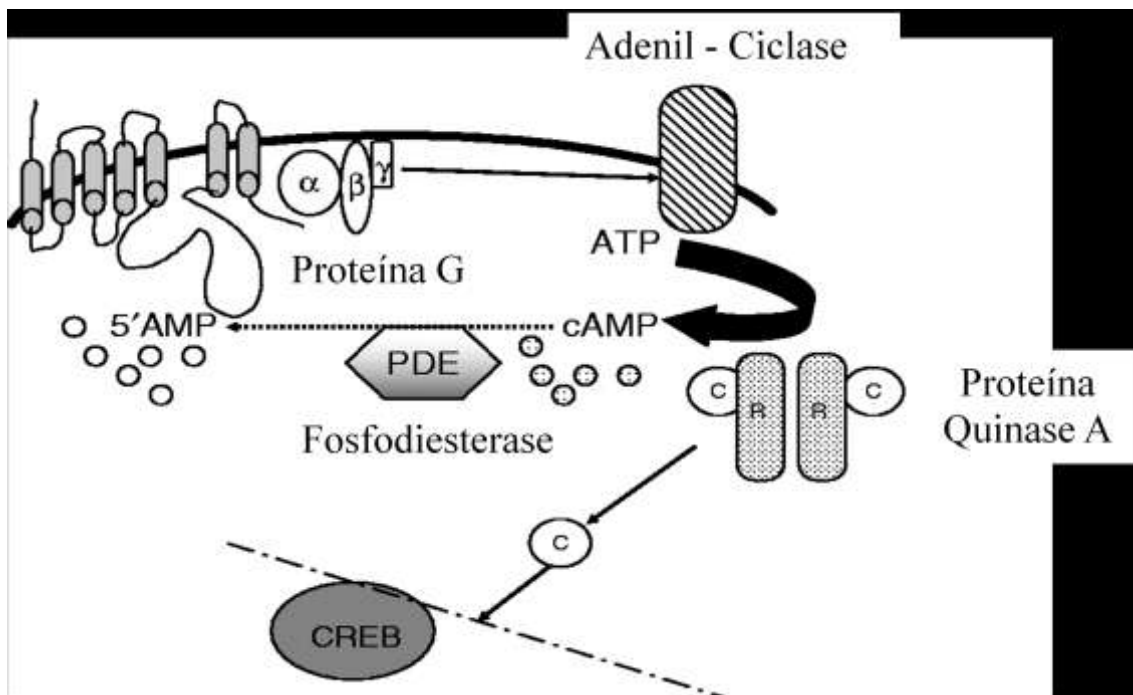


Figura 1 – O papel da fosfodiesterase na via do cAMP. Adaptado de (11). O receptor acoplado à proteína G é ativado por um ligante extracelular (por exemplo um hormônio), o que ocasiona uma alteração conformacional do receptor. A subunidade G α se desprende do complexo, liga-se à adenil-ciclase, que catalisa a conversão de ATP em cAMP. A elevação de cAMP intracelular leva à dissociação da subunidade catalítica da subunidade regulatória da proteína quinase A. A ativação da proteína quinase A pode então fosforilar uma série de alvos que regulam o fluxo de enzimas efetoras e canais iônicos, bem como ativa a transcrição de genes específicos que exercem papel no crescimento e diferenciação celular. As PDEs são fundamentais na regulação dessa via, uma vez que é a única capaz de hidrolisar o cAMP para sua forma inativa 5'-AMP. Abreviaturas: CREB - proteína de ligação ao elemento de resposta cAMP; cAMP – adenosina monofosfato cíclico; 5'-AMP – 5' adenosina monofosfato.

As Fosfodiesterases – PDEs

As PDEs humanas compreendem uma complexa super família de enzimas derivadas de 21 genes e separadas em onze isoformas (PDE 1 - 11), difundidas nos diferentes tecidos e células, incluindo coração e cérebro (Figura 2). A transcrição gênica, a partir de diferentes locais de iniciação de RNAs mensageiros, resulta na geração de aproximadamente 100 isoformas diferentes de proteínas de PDE, que podem ser encontradas em todas as células e em diversos compartimentos intracelulares.

As distintas isoformas de PDE possuem diferenças cinéticas, de distribuição e susceptibilidade à inibição farmacológica bem como certa seletividade aos diferentes substratos (cAMP e cGMP). Apesar de possuírem inúmeras diferenças, as PDEs possuem características estruturais em comum. Todas as 11 isoformas possuem um domínio catalítico conservado, de aproximadamente 300 aminoácidos, localizado na porção C-terminal e regiões de regulação variáveis na porção N-terminal. Em mamíferos, três das 11 famílias de PDE hidrolisam seletivamente cAMP (PDE 4, 7 e 8), três famílias são seletivas para cGMP (PDE 5, 6 e 9), e cinco famílias apresentam especificidade para ambos, porém a eficiência é variável (PDEs 1, 2, 3, 10, e 11).

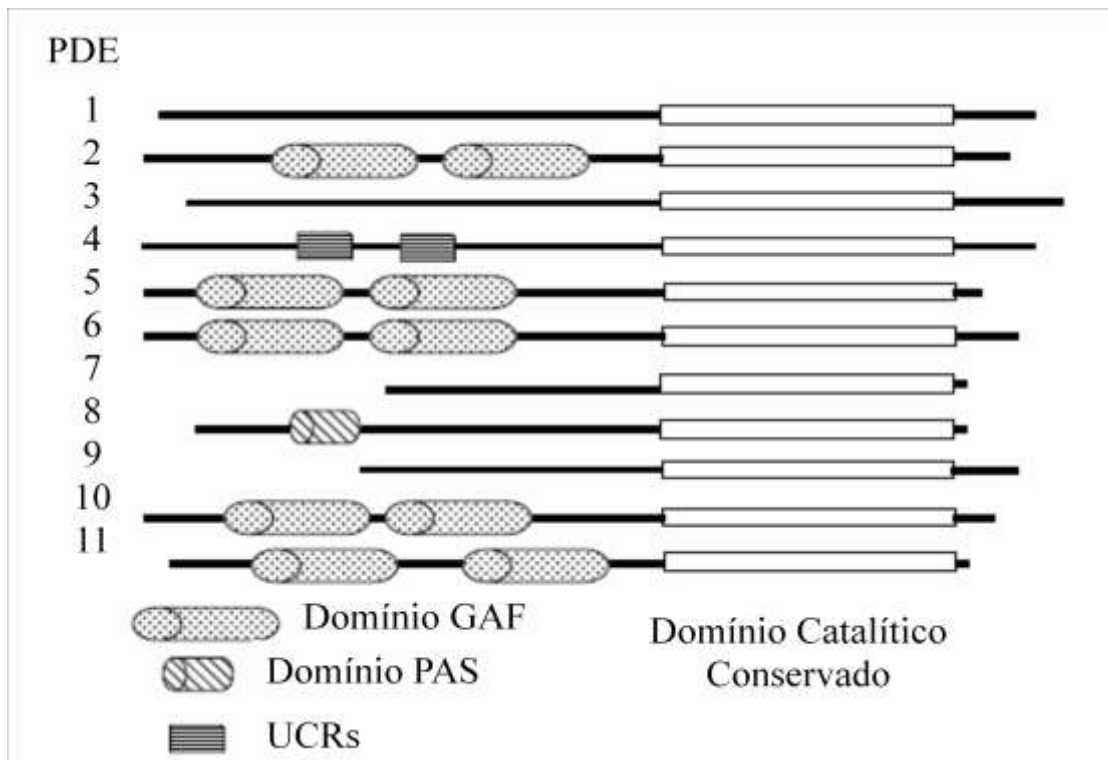


Figura 2 – Representação das 11 famílias de fosfodiesterase humanas. Adaptado de (11). A principal característica estrutural na família PDE4 e que a difere das demais isoformas, é a presença de dois domínios *upstream conserved region* na região N-terminal (UCR1 e UCR2). Esses domínios têm sido demonstrados como módulos necessários à ativação de PDE4 sobre fosforilação pela proteína quinase A (PKA). A família PDE4 também possui estruturas em comum a outras isoformas da família, tais como: o domínio GAF, que é responsável por regular a atividade catalítica das fosfodiesterases; e o domínio PAS, uma classe onipresente de domínio de transdução. Existe uma possível sobreposição entre a função do domínio GAF e do domínio PAS.

Atualmente sabe-se que seis famílias de PDEs possuem papel tanto na fisiologia como em doenças endócrinas: PDE1, PDE2 (PDE2A), PDE3 (PDE3A), de PDE4 (PDE4B e PDE4D), PDE8 (PDE8A e PDE8B), e PDE11 (PDE11A).

É importante salientar que o padrão de expressão das isoformas de PDEs varia de acordo com o desenvolvimento, estado proliferativo e estímulos hormonais da célula.

Fisiologicamente, as fosfodiesterases estão amplamente distribuídas pelas glândulas endócrinas (supra-renais, tireóide, hipófise, testículos e ovários). Dentre suas principais propriedades podemos citar: papel na função do espermatozóide (PDE1); regulação da secreção de ACTH e aldosterona (PDE2); importante impacto sobre a lipólise, glicogenólise e secreção de insulina (PDE3); fertilidade (PDE4B e 4D); regulação da esteroidogênese supra-renal, níveis de TSH e controle de sinalização e esteroidogênese nas células de Leydig nos testículos (PDE8); e também exerce papel na produção de espermatozóides (PDE11) (11, 20).

PDE1, PDE2, PDE4, e PDE11A são as PDEs mais expressas na hipófise. O papel fisiológico destas PDEs na hipófise humana ainda não foi extensamente investigado (11, 12, 21), porém as fosfodiesterases estão diretamente relacionadas a diversos distúrbios endocrinológicos tanto na hipófise como nas glândulas adrenais, tireóide, testículos e ovários (11).

O papel das PDEs em doenças do sistema endócrino ainda é pouco conhecido e sem dados concretos. Estudos sugerem que PDE2A possa exercer um papel na patogênese de adenomas hipofisários secretores de GH devido à interação proteica entre AIP e essa fosfodiesterase (22). Quanto à PDE4, infere-se que essa possa ter papel no adenoma tireoideano tóxico autônomo devido à uma mutação de G_{α} ou de receptores de TSH (23). Já na hipófise, presume-se que a família PDE4A possua papel importante na patogênese de adenomas secretores de GH devido à conhecida interação entre AIP e

PDE4A5 (isoforma análoga à PDE4A4 humana) (12, 24-26). Quanto à família PDE8B, estão associadas às predisposições gênicas para o desenvolvimento da doença nodular pigmentada das supra-renais (27) e, na tireóide, há associação entre PDE8B gene rs4704397 snp e os níveis circulantes de TSH, a qual pode ser responsável pelo aumento de TSH em pacientes com evidência de autoimunidade à tireóide e para o hipotireoidismo subclínico em pacientes grávidas (28). Também podemos citar a família PDE11A, a qual possui expressão alterada em adenomas hipofisários secretores de GH (24); associação à predisposição genética para o desenvolvimento da doença nodular pigmentada das supra-renais (29); PDE11A também é descrito como um modificador de fenótipo em pacientes com complexo de Carney devido à mutações no gene PRKAR1A (30); já nos testículos, essa isoforma está associada à tumores familiares de células germinativas testiculares (31).

A codificação das isoformas de PDE4 em mamíferos é remetida a quatro genes diferentes (PDE4A, PDE4B, PDE4C e PDE4D) e cada um desses genes codifica múltiplas isoformas, através da utilização de promotores específicos para cada isoforma e processamento alternativo de RNA mensageiro (32-34).

As PDE4s se diferem de outras famílias de PDE por uma identidade na sequência da região catalítica das proteínas (32-34) e pela presença de regiões de "assinatura" da sequência denominada UCRs (*upstream conserved region*): UCR1 e UCR2, localizadas no terço N-terminal das proteínas (35). A Figura 3 demonstra esquematicamente a estrutura de PDE4A4 e PDE4A8.

Podemos dividir as várias isoformas codificadas por um único gene em três grupos: isoformas 'longas' que contêm tanto UCR1 e UCR2, isoformas "curtas" que não possuem UCR1, mas incluem UCR2 e isoformas 'super-curtas' que não possuem UCR1 e contêm um UCR2 truncado (21).

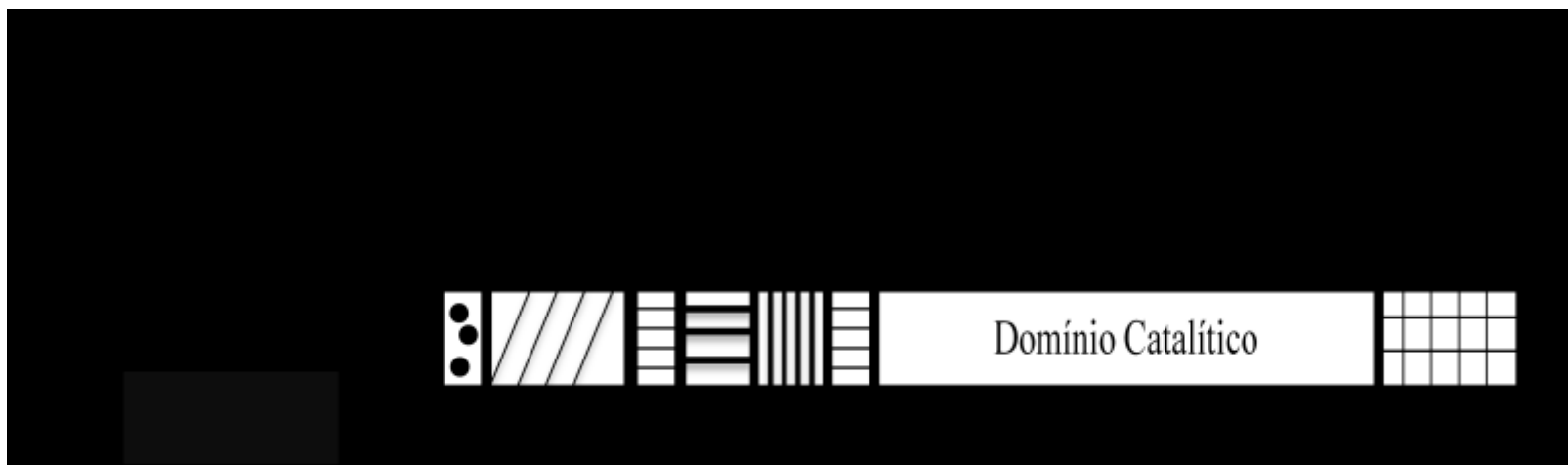


Figura 3 – Representação esquemática de PDE4A4 e PDE4A8. UCR1 e UCR2 - *upstream conserved region*; LR1 e LR2 – regiões ligantes.

Em 2008 foi descrita a clonagem, seqüência, expressão e propriedades funcionais da isoforma que chamamos PDE4A8. Essa é uma isoforma longa da família PDE4A com uma região N-terminal distinta de PDE4A4 humana, PDE4A10 e PDE4A11. Foi relatado também sua expressão em níveis significativos em diversas regiões do cérebro, assim como em outros tecidos (36-38).

PDE4A4 (análoga humana da forma PDE4A5 em rato) é uma isoforma expressa em uma grande variedade de tecidos (pulmão e várias regiões cerebrais) (36-39). Essa isoforma possui UCR1 e UCR2 bem como uma região N-terminal única, a qual é altamente conservada em mamíferos e possui 88% de similaridade com a região N-terminal de PDE4A5 em ratos (37). Esse alto grau de conservação entre espécies sugere que essa região amino-terminal única da isoforma PDE4A4 tem funções específicas, descritas em 2003 por Bolger *et al* (25).

Comparada a outras isoformas de PDE, PDE4A4 humana associa-se seletivamente com a proteína AIP (Proteína de interação com receptor aril hidrocarbono) também chamado de XAP2 ou ARA9, um membro da família das imunofilinas (25) (Figura 4). O truncamento de sua região N-terminal altera atividades enzimáticas e o direcionamento intracelular de proteínas (40, 41).



Figura 4 – Representação esquemática de PDE4A4 e os locais de ligação com AIP (Proteína de interação com receptor aril hidrocarbono). UCR1 e UCR2 - *upstream conserved region*; LR1 e LR2 – regiões ligantes.

AIP – Proteína de interação com receptor aril hidrocarbono

O gene AIP contém 6 éxons codificantes, não sofre *imprinting* e é expresso de forma ubíqua (42). O AIP é um gene que encontra-se localizado no cromossomo 11q13.3 em pacientes com adenomas hipofisários isolados familiares e, muito raramente, em casos de tumores hipofisários esporádicos (2, 12). O AIP consiste em 330 aminoácidos; disposição estrutural semelhante ao receptor glicocorticóide associado a imunofilina FKBP52 e imunofilina FKBP12; contém três domínios tetratricopeptídeos (TPR), que conserva 34 seqüências de aminoácidos e tem papel fundamental nas interações proteína-proteína (26, 43). A Figura 5 demonstra a estrutura da molécula de AIP humano.

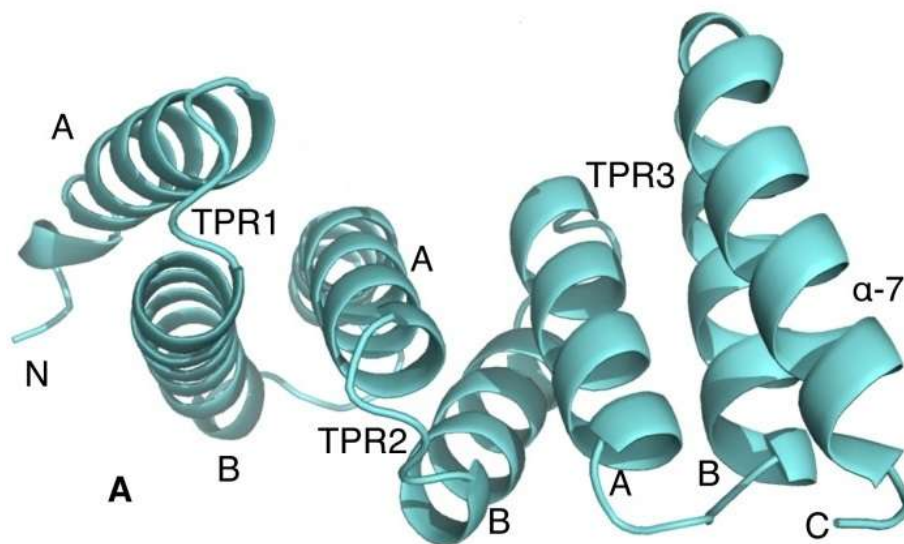


Figura 5 – Desenho PyMol da estrutura da proteína de interação com receptor aril hidrocarbono humano (AIP).

Em 2006, em um estudo de Vierimaa *et al*, foram identificadas mutações germinativas clássicas no gene AIP em pacientes finlandeses com predisposição a adenoma hipofisário, assim como em pacientes com tumores hipofisários esporádicos. Além das mutações, também foi documentada perda de heterozigose em todos os

tumores estudados, sugerindo que o gene AIP teria um papel supressor de tumor (2). Dizemos que um gene supressor de tumor é aquele que quando íntegro, reduz a chance de uma célula se tornar um tumor. A inativação de tais genes pode ser causada por mutações ou deleções envolvendo mecanismos genéticos e/ou epigenéticos. A completa inativação de uma proteína supressora de tumor acarreta em um descontrole do ciclo celular e no desenvolvimento de neoplasias.

O AIP possui vários parceiros tais como: o receptor hidrocarboneto aromático (AhR), PDE4A5, PDE2A, survivin, Tom20, vírus da hepatite B proteína X, receptor 1 do hormônio β da tireóide (TR β 1), o vírus Epstein-Barr codificado antígeno nuclear 3 e receptor ativado pelo proliferador de peroxissoma – PPAR α (44).

Como exemplo podemos citar o receptor hidrocarboneto aromático (AhR), responsável por medir a resposta celular a uma variedade de componentes xenobióticos, incluindo dioxinas. O AIP é uma molécula que acompanha AhR e está relacionada com a estabilização do complexo citoplasmático formado por AhR e a proteína chaperona Hsp-90. Ahr é um fator de transcrição que na presença do AIP é mantido inativo no citoplasma. Esse complexo pode ser desestabilizado na presença de cancerígenos ou na ausência de AIP, fazendo com que Ahr migre para o núcleo celular. Uma vez no núcleo celular, a proteína AIP se desprende do complexo e retorna ao citoplasma, enquanto o Ahr interage diretamente com regiões de DNA promotoras – XRE (*Xenobiotic Regulatory Enhancer*), regulando a transcrição de diversos genes (45).

Outra possível participação do AIP na tumorigênese hipofisária pode ocorrer devido à interação com proteínas envolvidas na via de sinalização do AMP cíclico. O AIP é capaz de interagir *in vitro* com PDE4A5 (25) e observou-se também que a proteína AIP com mutação perde sua capacidade de interagir com PDE4A5, possivelmente interferindo na cascata intracelular de cAMP (12). Dessa forma, o gene

AIP está inserido na lista de genes conhecidos e amplamente estudados na tentativa de elucidar a tumorigênese endócrina.

Atualmente, mais de 40 mutações diferentes de AIP já foram identificadas em pacientes com tumores hipofisários familiares isolados (Figura 6) e temos também um número de amostras dessas mutações do AIP que perderam sua função se comparadas à proteína nativa (43, 46). Existem diferentes tipos de mutação do gene AIP descritas, são elas: *Missense* – essa mutação causa uma mudança em um par de bases, a qual resulta na alteração de um aminoácido e conseqüentemente na sequência de proteínas do AIP; *Nonsense* – nessa mutação é observada a inserção de um códon de parada, fazendo com que a proteína AIP seja muito mais curta do que deveria ser. Isto provoca um efeito importante sobre a função da proteína AIP; *Deleções/Inserções* – um ou mais códons inteiros são excluídos/inseridos, resultando assim na diminuição/aumento do comprimento da proteína AIP; *Mutações de leitura* – ocorre quando uma ou duas bases são excluídas/inseridos, fazendo com que toda a leitura do códon mude e, dessa forma, cada aminoácido seguinte à mutação; *Promoter* – mutação na região promotora que afeta a regulação do gene; *Grandes deleções* – nessa mutação grande segmento do gene é eliminado, o que resulta na proteína AIP sendo gravemente alterada; *Splice Site* – essa mutação afeta a montagem do gene e anomalias causadas por tal mutações no local de *splice* geralmente perturbam severamente a estrutura da proteína.

De qualquer modo, o mecanismo de ação do AIP permanece desconhecido, apesar de estabelecido especificamente sua interação com o cAMP específico para PDE4A4.

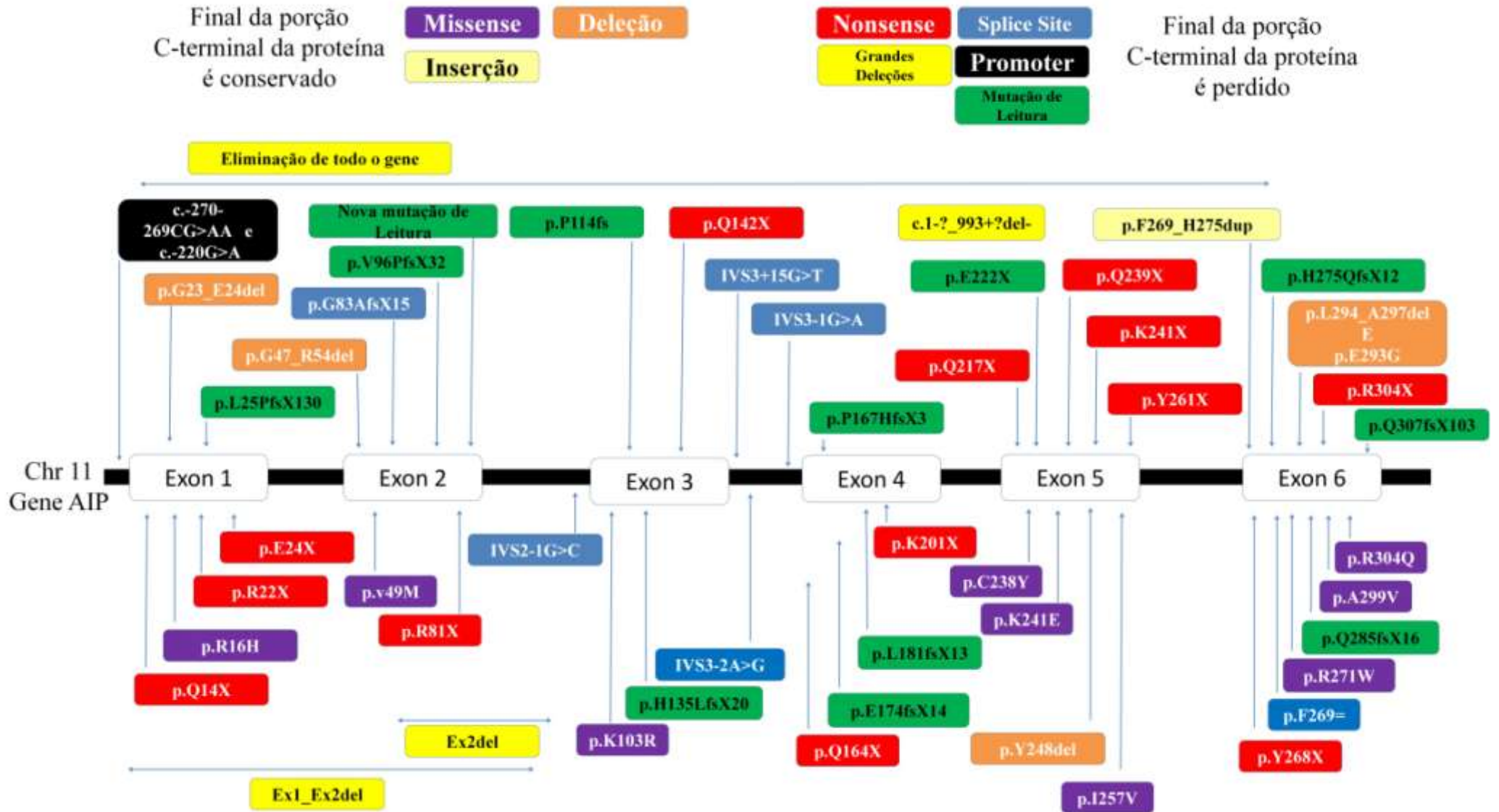


Figura 6 – Mutações da proteína de interação com receptor aril hidrocarbono (AIP) descritas na literatura. Adaptada de: <http://www.fipapatient.org/aip/>

O papel das fosfodiesteras bem como sua expressão na hipófise humana ainda não foi extensamente investigado. A grande maioria dos estudos foram realizados em ratos/camundongos ou culturas celulares. Apesar de serem protocolos validados, a realização de experimentos em humanos é extremamente importante visto que há diferenças estruturais entre as isoformas de PDEs de humanos e outras espécies animais.

Sendo assim, a realização do presente estudo mostra-se inédita e importante para a compreensão da expressão de isoformas da família PDE4A em diferentes adenomas hipofisários esporádicos bem como em adenomas hipofisários com mutação do gene AIP, visto que inúmeros artigos demonstram a interação entre as fosfodiesterases e essa molécula em ratos/camundongos. Demonstrar a expressão de PDE4A nesses adenomas pode ser um caminho importante para o conhecimento da tumorigênese hipofisária.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Estudar a expressão das fosfodiesterases da família 4A (PDE4A4 e PDE4A8) em adenomas hipofisários esporádicos (secretores de GH, PRL e ACTH e em tumores clinicamente não funcionantes produtores de FSH – NFPAAs - sem mutação identificada de AIP) e em adenomas hipofisários (secretores de GH) com diferentes mutações do gene que codifica a proteína de interação com o receptor aril hidrocarbono (AIP).

MATERIAIS E MÉTODOS

Considerações éticas

Para a realização do presente estudo, o projeto de pesquisa foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação em Seres Humanos (COEP/UFMG): protocolo ETIC 404/07 e CAAE 43738914.4.00005149 (anexo I).

Grupos de Estudo

Foram incluídos no estudo, adenomas hipofisários representativos de cada um dos principais subtipos de adenomas:

(39)

- Secretores de hormônio do crescimento (GH) sem mutação identificada de AIP – 7 lâminas de diferentes pacientes;
- Secretores de prolactina (PRL) sem mutação identificada de AIP – 4 lâminas de diferentes pacientes;
- Secretores de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) sem mutação identificada de AIP – 5 lâminas de diferentes pacientes;
- Adenomas clinicamente não funcionantes positivos para FSH (NFPAs) sem mutação identificada de AIP – 4 lâminas de tumores diferentes;
- Secretores de hormônio do crescimento (GH) com mutação AIP – 12 lâminas, sendo 2 lâminas de cada mutação:
 - Q164* (c490C>T) – *nonsense*
 - E222* (c622dupC) – *nonsense*
 - R304* (c.910C>T) – *nonsense*
 - F269F (c.807C>T) – *splice site*
 - F269_H275dup (c.805_825dup) – inserção
 - R304Q (c.911G>A) - *missense*

- Hipófises normais – 3 lâminas provenientes de diferentes indivíduos.

Amostras

As amostras de tecido hipofisário foram obtidas de blocos de parafina provenientes do material da biópsia realizada após a cirurgia e a comprovação anatomopatológica de adenoma hipofisário. O tipo de tumor foi determinado com base em resultados clínicos e bioquímicos anteriores à cirurgia e determinação imuno-histoquímica realizada pelo Laboratório de Anatomia Patológica localizado na Faculdade de Medicina UFMG. Após o diagnóstico histopatológico, as lâminas com os cortes dos blocos de parafina foram montadas, sendo que todas as amostras utilizadas mostraram mais de 90% das células do tumor específico (confirmação realizada pela técnica de hematoxilina – eosina – HE).

As hipófises normais foram coletadas de autópsias no prazo máximo de 24 h pós morte dos pacientes e realizou-se a análise da reticulina no tecido a fim de que fosse excluída qualquer anormalidade endócrina.

Anticorpos

Para a marcação das fosfodiesterases, foram utilizados os seguintes anticorpos: (1) anticorpo monoclonal de camundongo (4A4-1), específico para PDE4A4 humano. Foi gerado contra o peptídeo a partir da sequência de SAERAERERQPHRPIERADA, correspondendo a região amino-terminal única de PDE4A4 (21, 37, 39), GenBank L20965); (2) anticorpo policlonal de coelho (7233), específico para PDE4A8 humana (21); (3) anticorpo monoclonal de camundongo (4E1.16), específico para PDE4A8 humano e gerado para o mesmo peptídeo do anticorpo policlonal descrito em (2), a partir da sequência KGDESRRETPESTRAN, correspondendo à região única do amino terminal de PDE4A8 (GenBank AY593872). Todos os anticorpos monoclonais foram purificados por diluição limitante e, em seguida, cultivados em

cultura. Os anticorpos foram então purificados a partir de sobrenadantes de cultura com uma matriz de afinidade de proteína G (Pierce-FisherThermoScientific, EUA).

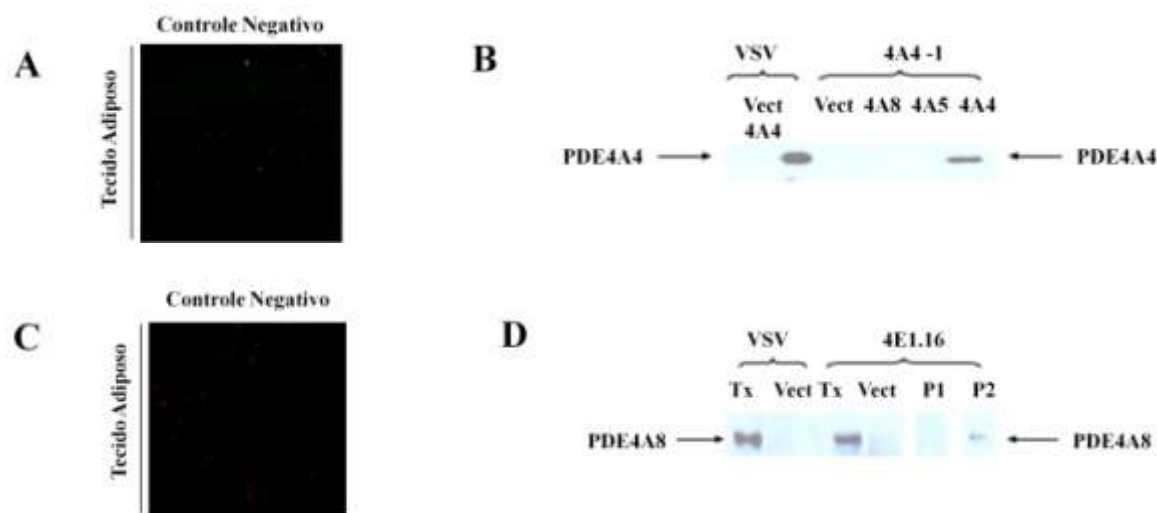


Figura 7 – Testes dos anticorpos anti – PDE4A4 e anti – PDE4A8

A. Imunofluorescência do controle negativo do anticorpo 4A4-1 em tecido adiposo.

B. Imunotransferência do anticorpo 4A4-1. Células COS7 foram transfectadas para expressar PDE4A4 humana (4A4), ou PDE4A8 humana (4A8), ou vetor (Vect). Todas as construções de PDE também codificavam um epítipo VSV no carboxil terminal da proteína. LDS-PAGE e a imunotransferência com um anticorpo contra o VSV, ou contra 4A4-1, foram realizados como descrito nos métodos. A proteína PDE4A4 migrou a 97 kDa.

C. Imunofluorescência do controle negativo do anticorpo 4E1.16 em tecido adiposo.

D. Imunotransferência do anticorpo 4E1.16. Extratos de células COS7 transfectadas para expressar PDE4A8-VSV ou com vetor (Vect), foram coradas imunologicamente com um anticorpo contra VSV, ou com 4E1.16. Em géis separados, os extratos foram imunotransferidos com 4E1.16 e o peptídeo usado como imunogênico (P1), ou um peptídeo não relacionado (P2). Todos os métodos foram tal como para a Figura 7B. A proteína PDE4A8 migrou a 102 kDa.

Já para a marcação das células específicas em cada adenoma hipofisário, foram utilizados os seguintes anticorpos policlonais de cabra, purificados por afinidade. (Santa Cruz Biotechnology, USA): (1) GH (L-20): criado contra um mapeamento de peptídeos próximo do N-terminal do GH de origem humana; (2) ACTH (P-12): criado contra um mapeamento de peptídeos dentro de uma região interna de POMC de origem humana. O locus genético de POMC (humano) de mapeamento 2p23.3; (3) PRL (C-17): criado contra um peptídeo mapeado perto do C-terminal da prolactina de origem humana. O local genético da PRL (humano) de mapeamento é 6p22.3.

Para a marcação das células secretoras de FSH em adenomas clinicamente não funcionantes foram utilizados dois diferentes anticorpos (de acordo com a PDE escolhida): (1) FSH (clone C10), um anticorpo monoclonal de camundongo purificado, que reage com a subunidade β do hormônio folículo-estimulante (Dako, California, USA) e (2) FSH (8746), anticorpo policlonal de coelho, purificado por afinidade que reage com o hormônio folículo-estimulante (Abcam, Cambridge, USA).

Como anticorpos secundários (responsáveis pela fluorescência) foram utilizados os seguintes anticorpos: (1) anti-cabra Alexa 546 (Invitrogen, EUA); (2) anti-cabra Alexa 488 (Invitrogen, EUA); (3) anti-coelho Alexa 488 (Invitrogen, USA); (4) anti-coelho Alexa 546 (Invitrogen, USA) (5) anti-camundongo Alexa 546 (Invitrogen, USA) ou (6) anti-camundongo DyLight 488 (Pierce-FisherThermo Scientific, EUA).

Imunofluorescência

Primeiramente os cortes passaram pelo processo de desparafinização e hidratação com banhos sucessivos de: xilol (3 banhos de 5 minutos cada), etanol 99,6% (2 banhos de 5 minutos cada), etanol 95% (um banho de 3 minutos), etanol 70% (um banho de 3 minutos), etanol 50% (um banho de 3 minutos), etanol 25% (um banho de 3 minutos) e água destilada (um banho de 3

minutos). Após esses processos, as lâminas foram transferidas para um recipiente de vidro pré-aquecido em banho maria (temperatura 94°C - 96 °C) contendo 400 ml de solução de reativação antigênica (Dako Califórnia, EUA, 40 ml de estoque em 360 mL de água), no qual permanecem por 30 minutos dentro do próprio banho maria (temperatura 94°C - 96 °C) e posteriormente, as lâminas ainda dentro da solução, permanecem por 20 minutos fora do banho maria. Hidratou-se os cortes com uma banho de água destilada (5 minutos) e um banho de PBS 1x (tampão fosfato-salino) por 10 minutos.

As lâminas foram secadas com papel absorvente e realizou-se um círculo em volta dos cortes com caneta Liquid Blocker. Os cortes foram então incubados em solução de bloqueio (1% de albumina bovina + 0,1% de Tween 20) à temperatura ambiente em câmara úmida durante 1 hora. Em seguida, a fim de colocalizar a fosfodiesterase selecionada (PDE4A4 ou PDE4A8) nas células específicas de cada tumor hipofisário, retirou-se a solução de bloqueio e sobre cada corte colocou-se uma solução contendo o tampão de incubação; o respectivo anticorpo hipofisário primário: anti-GH (L20; 1:50), anti-PRL (C-17; 1:50), anti-ACTH (P-12; 1:50), anti-FSH (clone C10; 1:25) ou anti-FSH (8746; 1:25); e também o anticorpo responsável pela marcação de PDE4A4 ou PDE4A8. As lâminas foram deixadas *overnight* a 4°C em câmara úmida. As lâminas foram lavadas em PBS 1x (4 banhos sucessivos de 3 minutos cada), secas com papel absorvente e então incubadas com o anticorpo secundário anti-cabra Alexa 546 (1:100, Invitrogen, EUA), anti-cabra Alexa 488 (1:100, Invitrogen, EUA), anti-coelho Alexa 488 (1:400, Invitrogen, USA), anti-coelho Alexa 546 (1:400, Invitrogen, USA) ou anti-camundongo DyLight 488 (1:400, Pierce-FisherThermo Scientific, EUA), de acordo com o anticorpo primário utilizado anteriormente, e incubadas em câmara úmida escura por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente as lâminas foram lavadas em PBS 1x (4 banhos sucessivos de 3 minutos cada), secas com papel absorvente e os cortes foram montados com meio de montagem 90% de glicerol e lamínula.

Análise das Imagens

A leitura foi realizada em microscopia confocal, utilizada para aumentar o contraste da imagem microscópica e construir imagens tridimensionais através da utilização de um orifício de abertura, *pinhole*, que permite uma grande definição de imagem em amostras mais espessas que o plano focal.

As imagens foram capturadas através do microscópio confocal (Leica TCS SP5), objetiva 63X, 630X e ampliação original. Todas as configurações confocais foram determinadas no início da sessão de leitura das imagens e manteve-se inalterada durante todo o experimento. Para a análise quantitativa, as imagens foram capturadas em oito bits e analisadas em escala de cinza (47). Foram capturadas 3-4 imagens de cada amostra, com cerca de 10-20 células escolhidas aleatoriamente em cada corte.

Vários testes preliminares foram realizados antes dos experimentos finais, a fim de reduzir a variabilidade intra e interensaio, tanto na hipófise normal como nos adenomas e para controlar fatores que poderiam afetar a interpretação final da imagem obtida. Sendo assim, determinamos previamente as melhores condições para o ensaio de imunofluorescência, tais como: diluição dos anticorpos primários e secundários, solução de bloqueio, e tipo de solução de recuperação antigênica. Testes adicionais no microscópio confocal para confirmar as melhores definições para a captura das imagens e definição do número de imagens por área de cada amostra que fossem representativos de toda a amostra também foram realizados.

As imagens obtidas com as leituras das lâminas foram analisadas em um programa específico – Image J (NIH, Bethesda, EUA), utilizado para quantificar a intensidade de fluorescência e a área. A fluorescência de fundo foi então subtraída da região de interesse. A intensidade de fluorescência corresponde ao nível de cinza da imagem, variando de zero (preto) a 255 (branco), com uma média da área (soma dos valores de cinza de todos os pixels, dividido pelo número de pixels / área).

Análise Estatística

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. Para a análise estatística foi utilizado o programa Prisma (GraphPad 4, La Jolla, CA, USA). Utilizamos o teste de Mann-Whitney ou ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls/Kruskal-Wallis dependendo da distribuição de normalidade da amostra. O valor de $P < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Expressão de PDE4A4 na hipófise normal versus adenomas hipofisários

Na Figura 8 demonstramos a expressão de PDE4A4 na hipófise normal e em diferentes adenomas hipofisários. Na imunofluorescência da hipófise normal, mostrou-se que PDE4A4 está presente no citoplasma de células produtoras de GH e de FSH, mas possui expressão mínima em células de PRL ou de ACTH. No entanto, os dados da expressão dessa fosfodiesterase nos adenomas hipofisários mostram uma expressão significativamente elevada de PDE4A4 em adenomas secretores de GH, PRL e ACTH, bem como no adenoma hipofisário clinicamente não funcionante de FSH (NFPA), quando comparadas com o tipo de célula correspondente na hipófise normal (Figura 8A, 8B, 8C e 8D). Todas as comparações foram significativas com $P < 0.0001$.

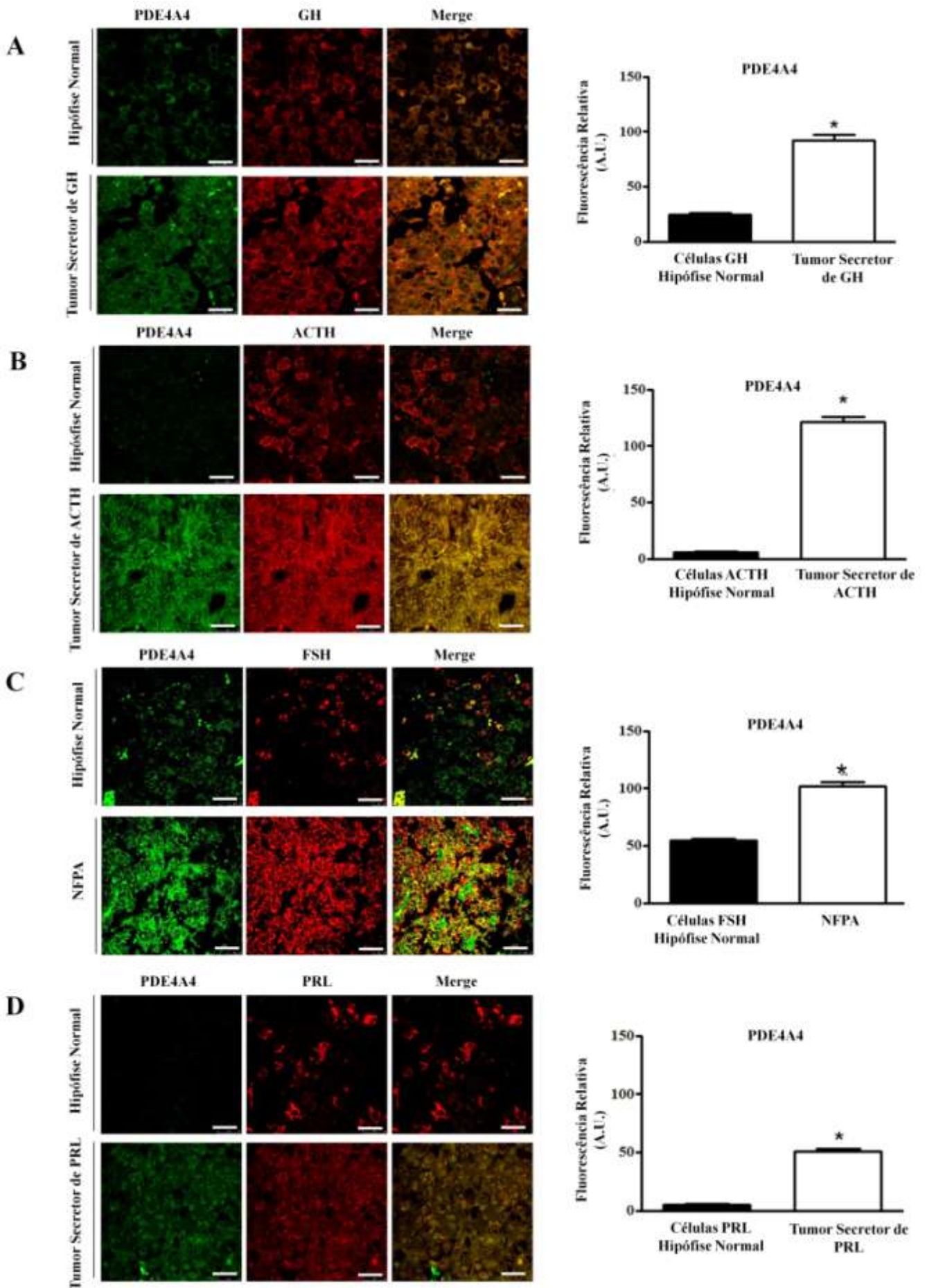


Figura 8 – Localização do PDE4A4 na hipófise

A, B, C e D. Imunofluorescência de dupla marcação utilizando o anticorpo monoclonal de camundongo 4A4-1 (anti camundongo DyLight 488 – coloração verde), anticorpo policlonal de cabra GH, ACTH e PRL (anti cabra Alexa 546 – coloração vermelha) e anticorpo policlonal de coelho FSH (anti coelho Alexa 546 – coloração vermelha) em hipófise normal e em adenomas secretores de GH, ACTH, FSH (adenoma clinicamente não funcionante FSH positivo) e PRL (**A, B, C e D** respectivamente); barra de escala: 25 μ m.

Os gráficos de barras da direita de cada painel demonstram a fluorescência relativa de PDE4A4 em cada adenoma, em comparação com suas respectivas células normais na hipófise sem adenoma. Todos os dados estão representados em média \pm S.E.M.; UA, unidades arbitrárias;

* P <0,0001.

Expressão de PDE4A8 na hipófise normal versus adenomas hipofisários

Na Figura 9 demonstramos a expressão de PDE4A8 em células normais da hipófise humana bem como em diferentes adenomas hipofisários (Figura 9). A imunofluorescência das células da hipófise normal mostrou que PDE4A8 está presente em todos os tipos de células hipofisárias, com uma expressão um pouco mais baixa em células de ACTH. Em todos os subtipos adenomas hipofisários, essa fosfodiesterase possui expressão em níveis significativamente mais elevados (Figura 9A, 9B, 9C e 9D). Todas as comparações foram significativas com $P < 0.0001$.

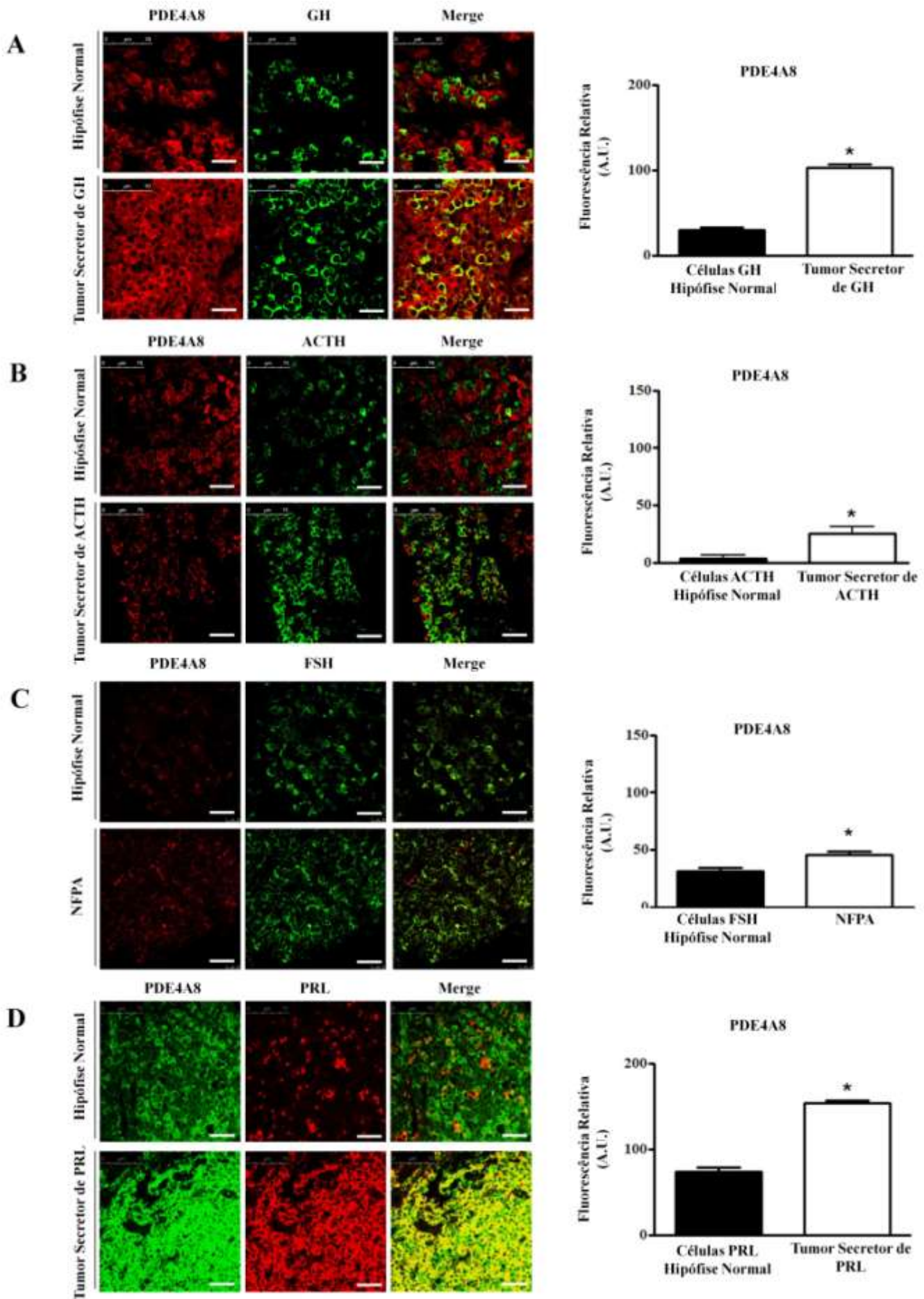


Figura 9 – Localização do PDE4A8 na hipófise

A, B e C. Imunofluorescência de dupla marcação utilizando o anticorpo monoclonal de camundongo 4E1.16 (anti camundongo Alexa 546 – coloração vermelha), anticorpo policlonal de cabra GH e ACTH (anti cabra Alexa 488 – coloração verde) e anticorpo policlonal de coelho FSH (anti coelho Alexa 488 – coloração verde) em hipófise normal e em adenomas secretores de GH, ACTH e NFPA (adenoma clinicamente não funcionante FSH positivo) (**A, B e C** respectivamente).

D. Imunofluorescência de dupla marcação utilizando o anticorpo policlonal de coelho 7233 (anti coelho Alexa 488 – coloração verde) e anticorpo policlonal de cabra PRL (anti cabra Alexa 546 – coloração vermelha) em hipófise normal e em adenoma secretor de PRL.

Barra de escala: 25 μ m.

Os gráficos de barras à direita de cada painel demonstram a fluorescência relativa de PDE4A8 em cada adenoma, em comparação com suas respectivas células normais na hipófise sem adenoma. Todos os dados estão representados em média \pm S.E.M.; UA, unidades arbitrárias;

* P <0,0001

Expressão de PDE4A4 em amostras de adenomas hipofisários secretores de GH com mutação AIP

Assim como demonstrado na imunofluorescência da hipófise normal e nos diferentes adenomas hipofisários secretores de GH, PRL e ACTH, bem como no adenoma hipofisário clinicamente não funcionante de FSH (NFPA), demonstramos também a expressão de PDE4A4 nas células de adenomas secretores de GH que sabidamente possuem mutação no gene AIP. Conforme demonstrado na Figura 10, existe certa expressão de PDE4A4 nas células produtoras de GH normais e expressão significativamente elevada de PDE4A4 nas células produtoras de GH no adenoma secretor de GH sem mutação no gene AIP. Quando observamos as amostras de 5 diferentes mutações do AIP, podemos notar diferentes expressões de PDE4A4. Em relação às células de GH da hipófise normal, podemos dizer que nas mutações F269F e R304Q a expressão de PDE4A4 é significativamente maior. Já para as mutações F269_H275dup, R304* e E222* é demonstrado que a expressão da fosfodiesterase 4A4 é significativamente diminuída quando comparadas com as células produtoras de GH no adenoma secretor de GH sem mutação no gene AIP. Todas as comparações significativas com $P < 0.0001$.

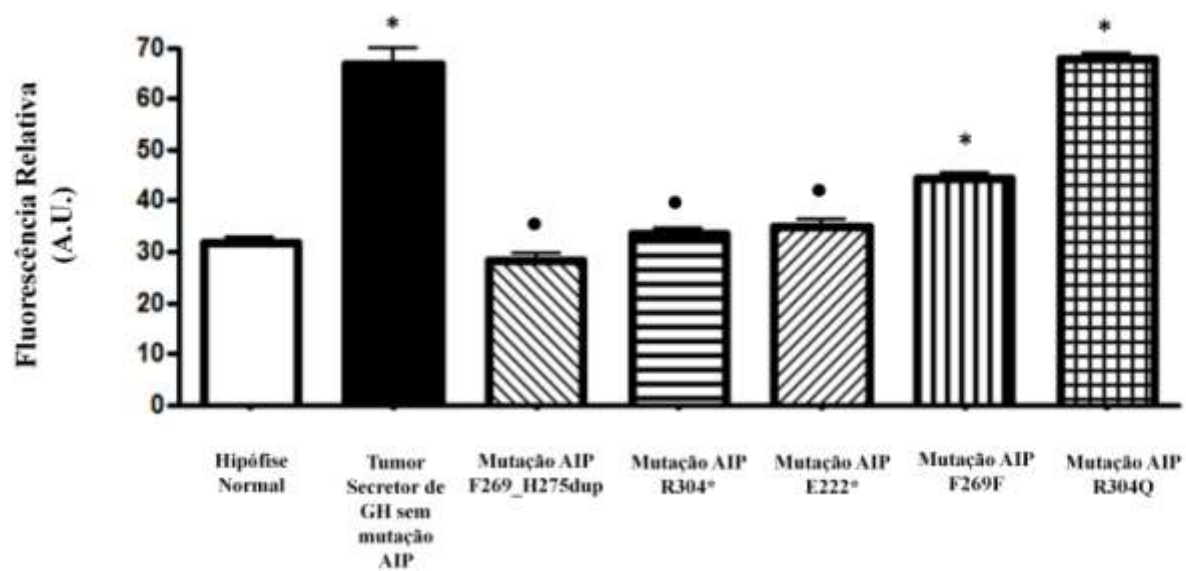
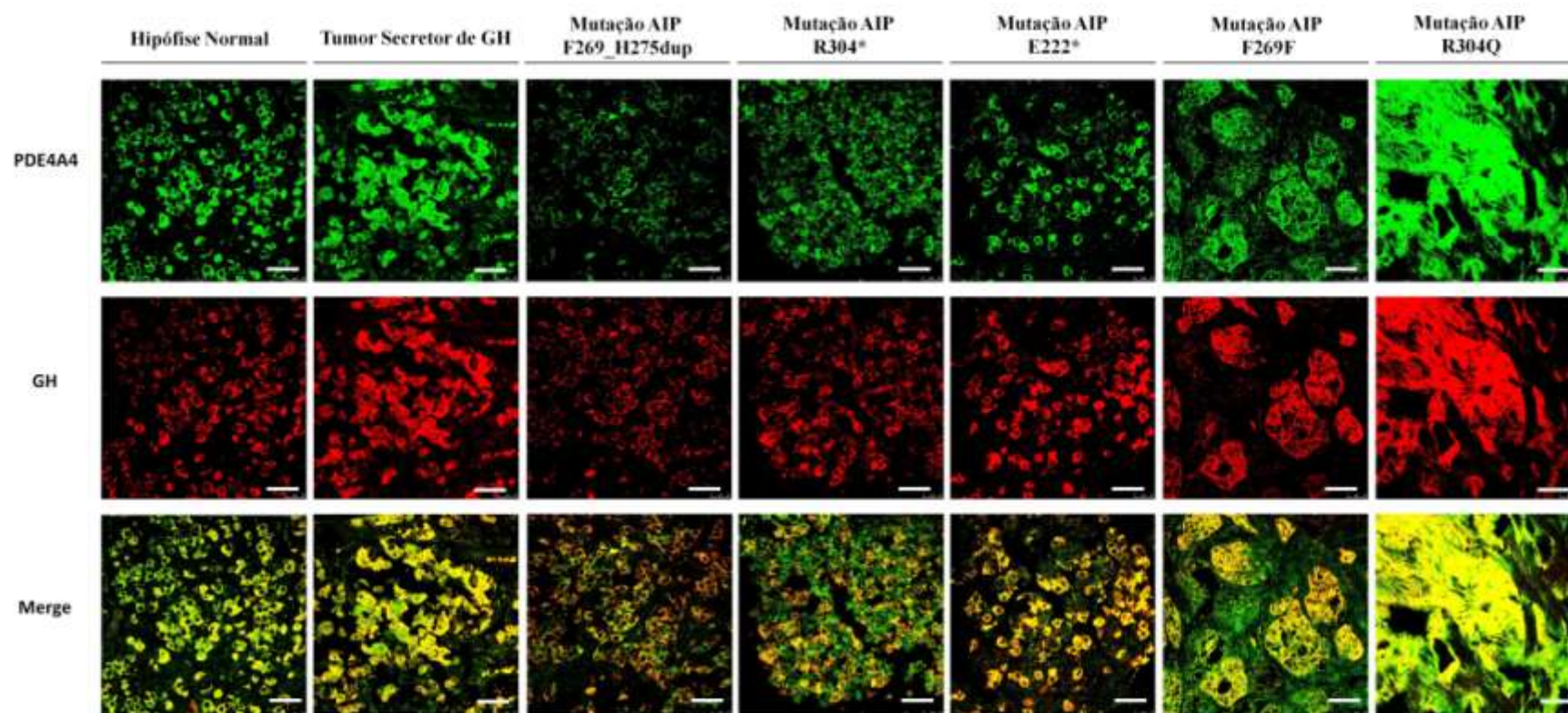


Figura 10 – Localização do PDE4A4 em adenomas secretores de GH com mutação AIP

Imunofluorescência de dupla marcação utilizando o anticorpo monoclonal 4A4-1 (coloração verde) e anticorpo policlonal GH (coloração vermelha) em hipófise normal e em adenomas secretores de GH com/sem mutação AIP; barra de escala: 25 μ m. O gráfico de barra demonstra a fluorescência relativa de PDE4A4 em células secretoras de GH normais, em células sem mutação AIP e em diferentes mutações do AIP. Todos os dados estão representados em média \pm S.E.M.; UA, unidades arbitrárias; P <0,0001, onde * é significância em relação às células da hipófise normal e ● é significância em relação às células sem mutação AIP.

Expressão de PDE4A8 em amostras de adenomas hipofisários secretores de GH com mutação AIP

Como observado em PDE4A4, também existe expressão de PDE4A8 nas células de adenomas secretores de GH que sabidamente possuem mutação no gene AIP. Observando a Figura 11, existe expressão de PDE4A8 nas células produtoras de GH normais e expressão significativamente elevada de PDE4A8 nas células produtoras de GH no adenoma secretor de GH sem mutação no gene AIP. Quando observamos as amostras de 4 diferentes mutações do AIP, podemos observar diferentes expressões de PDE4A8. Em relação às células de GH da hipófise normal, podemos dizer que nas mutações Q164* e F269_H275dup a expressão de PDE4A8 é significativamente menor, porém para a mutação R304Q é significativamente maior. Também é demonstrado que a expressão da fosfodiesterase 4A8 nas mutações Q164*, F269_H275dup e R304* é significativamente diminuída quando comparadas com as células produtoras de GH no adenoma secretor de GH sem mutação no gene AIP. Todas as comparações significativas com $P < 0.0001$.

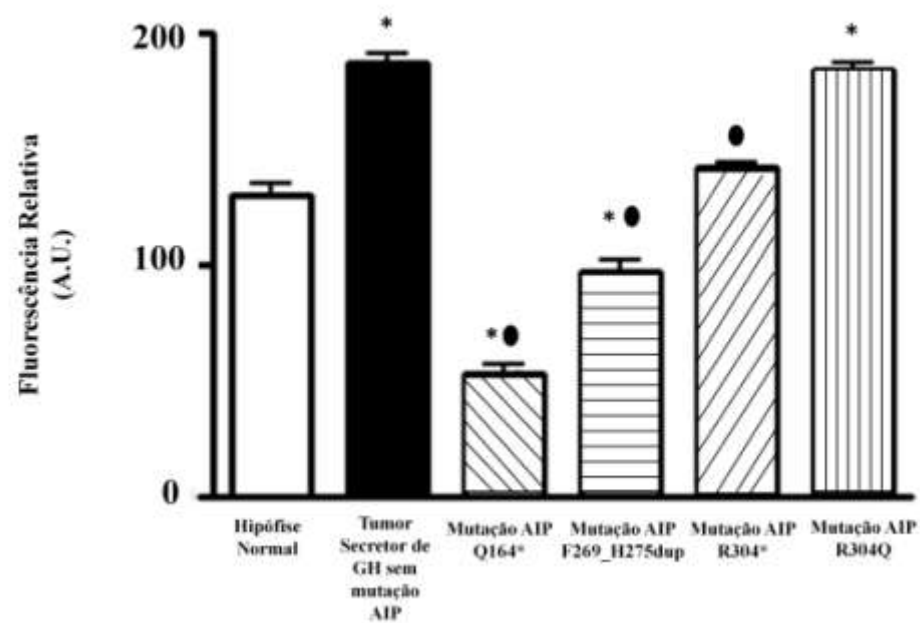
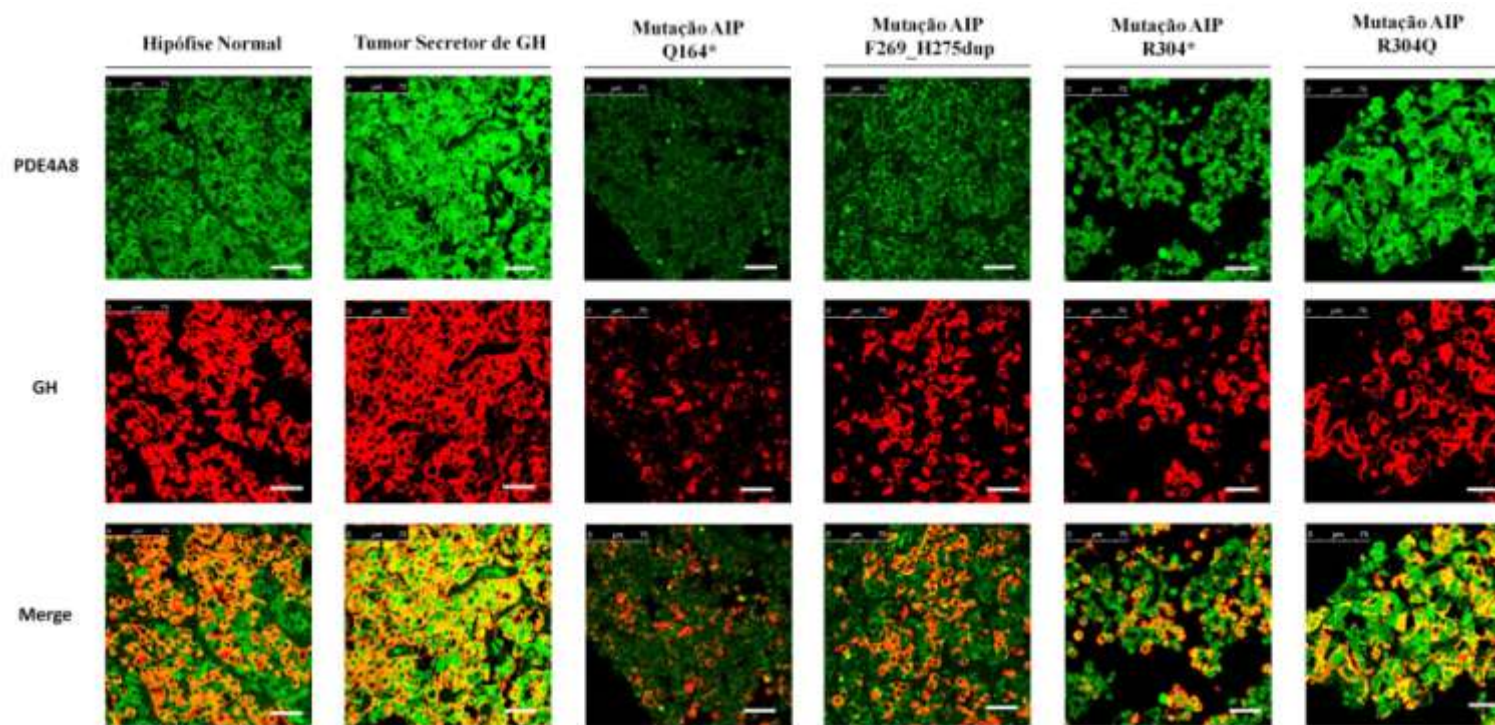


Figura 11 – Localização do PDE4A8 em adenomas secretores de GH com mutação AIP. Imunofluorescência de dupla marcação utilizando o anticorpo monoclonal 4E1.16 (coloração verde) e anticorpo policlonal GH (coloração vermelha) em hipófise normal e em adenomas secretores de GH com/sem mutação AIP; barra de escala: 25 μ m. O gráfico de barra demonstra a fluorescência relativa de PDE4A8 em células secretoras de GH normais, em células sem mutação AIP e em diferentes mutações do AIP. Todos os dados estão representados em média \pm S.E.M. ; UA, unidades arbitrárias; P <0,0001, onde * é significância em relação às células da hipófise normal e ● é significância em relação às células sem mutação AIP.

DISCUSSÃO

A família das fosfodiesterases desempenham um importante papel na sinalização de cAMP em diversos órgãos e tecidos (10, 48-50) nos quais são responsáveis por catalisar a clivagem do cAMP em 5'AMP e dessa forma regular os níveis de cAMP no interior das células. A presença de PDE4A na hipófise pode ser regulada por uma interação específica proteína – proteína, como é o caso de PDE4A5 (PDE4A4 em seres humanos) que interage seletivamente com AIP (25).

Nesse estudo conseguimos demonstrar que tanto PDE4A4 como PDE4A8 são expressos na hipófise humana e que essa expressão é significativamente aumentada nos diferentes adenomas estudados, quando comparamos a célula tumoral com sua respectiva célula na hipófise normal.

Revisando a literatura, podemos encontrar estudos demonstrando a presença de PDE4A, PDE4B e PDE4D em células da hipófise e adenomas através da presença de RNA mensageiro (24) porém não encontramos nenhum estudo que demonstre precisamente, como aqui evidenciado, a distribuição dessas isoformas nas células hipofisárias normais e em diferentes adenomas hipofisários.

A expressão de PDE nas células é muito importante para a devida regulação das vias de sinalização do cAMP. Em casos onde há a desregulação dessa via, conseqüentemente há desregulação da homeostasia. Demonstramos nesse estudo a expressão aumentada tanto de PDE4A4 como de PDE4A8 nos quatro diferentes adenomas hipofisários (secretores de GH, PRL, ACTH e NFPA - adenoma clinicamente não funcionante FSH positivo) em relação às mesmas células em hipófise normal.

Na via do cAMP na hipófise, o receptor acoplado à proteína G é ativado quando o hormônio liga-se a ele, o que ocasiona uma alteração conformacional do receptor. A subunidade G_{α} se desprende do complexo, liga-se à adenil-ciclase, que catalisa a

conversão de ATP em cAMP. A elevação de cAMP intracelular leva à dissociação da subunidade catalítica da subunidade regulatória da proteína quinase A. A ativação da proteína quinase A pode então fosforilar uma série de alvos que regulam o fluxo de enzimas efetoras e canais iônicos, bem como ativa a transcrição de genes específicos que exercem papel no crescimento e diferenciação celular. As PDEs são fundamentais na regulação dessa via, uma vez que é a única capaz de hidrolisar o cAMP para sua forma inativa 5'-AMP. Nos adenomas hipofisários há uma liberação aumentada de hormônios o que implica em consequente aumento de PKA ativando a transcrição de genes promotores de crescimento celular (Figura 12). A expressão aumentada dessas fosfodiesterases nos adenomas hipofisários esporádicos sugere uma possível adaptação/compensação à tumorigênese, na tentativa de supressão do efeito proliferativo (Figura 12).

Sabe-se que seis famílias de PDEs possuem papel tanto na fisiologia como em doenças endócrinas: PDE1, PDE2, PDE3, PDE4, PDE8 e PDE11. O padrão de expressão das isoformas de PDEs varia de acordo com o desenvolvimento, estado proliferativo e estímulos hormonais da célula. No entanto, é importante salientar que a compreensão das funções das PDEs é de difícil entendimento devido ao fato das propriedades catalíticas de algumas isoformas de PDE serem semelhantes. Sendo assim, a atribuição de um papel específico a uma determinada isoforma de PDE pode ser precipitada necessitando de estudos específicos a respeito de sua localização e função celular.

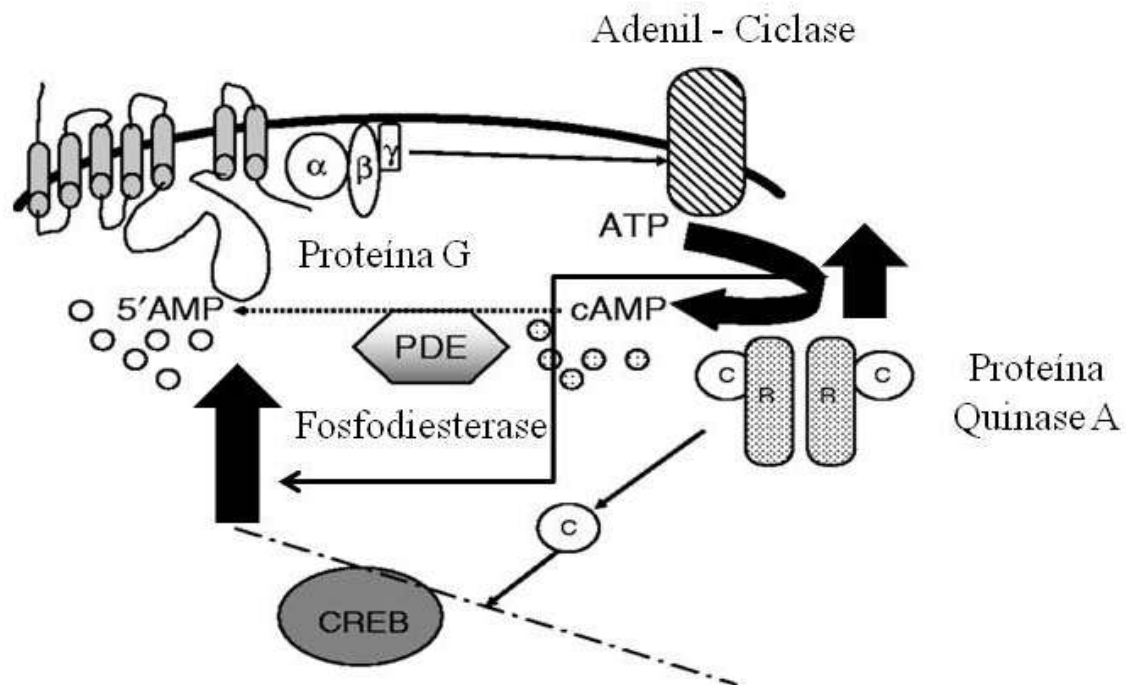


Figura 12 – O papel da fosfodiesterase na via do cAMP em tumores hipofisários sem a mutação do AIP. O receptor acoplado à proteína G é ativado pelo hormônio produzido em excesso no adenoma, o que ocasiona em aumento da conversão de ATP em cAMP e consequente hiperativação da proteína quinase A. Essa cascata propicia a ativação da transcrição de genes específicos que exercem papel no crescimento e diferenciação celular, assim ocasionando o aumento de células no adenoma. Em contra resposta, como compensação na tumorigênese, observamos aumento de PDEs nos adenomas esporádicos. Abreviaturas: CREB - proteína de ligação ao elemento de resposta cAMP; cAMP – adenosina monofosfato cíclico; 5'-AMP – 5' adenosina monofosfato.

A expressão de PDE4A4 e PDE4A8 na hipófise humana é demonstrada nesse estudo de forma clara e objetiva. Podemos afirmar que ambas as isoformas são presentes nos diferentes tipos celulares constituintes da hipófise humana (somatotrofo, corticotrofo, lactotrofo e gonadotrofo). O padrão de expressão dessas PDEs variaram de acordo com o tipo celular, sendo que para PDE4A4 a expressão em células hipofisárias normais secretoras de GH e FSH foi maior do que em células secretoras de ACTH e PRL. Já para PDE4A8, a expressão foi maior em células secretoras de PRL, GH e FSH.

Pouco se sabe a respeito da expressão de fosfodiesterases na hipófises e menos ainda na hipófise humana, uma vez que a grande maioria dos estudos demonstra a associação entre PDEs e funções endócrinas em animais.

A tumorigênese hipofisária ainda é desconhecida. Existem alguns estudos demonstrando que a interação de PDE4A4 com AIP possa ser de grande importância visto que o gene AIP é considerado um gene supressor de tumor e dentre as diversas mutações descritas há indícios que alterações na estrutura dos domínios TPR da molécula AIP podem ser preditores de adenomas hipofisários (43). Cerca de 30% das famílias com FIPA e 50% das acromegalias familiares possuem mutação no gene AIP (51).

Aproximadamente 75% das mutações do AIP interrompe completamente a porção C-terminal do domínio TPR e/ou o Ca-7h (52). A grande maioria das mutações *missense* afetam as duas partes finais do domínio TPR e Ca-7h , ambas envolvidas nas interações com proteínas. Proteínas ligantes à AIP, tais como Ahr e PDE4A4, tem sido demonstradas como potenciais ligantes à parte Ca-7h da molécula AIP. De que forma a ausência de AIP ou sua disfunção conduz à tumorigênese e como as interações que são rompidas predisõem as células para a tumorigênese ainda são mal compreendidas e também difícil de prever, visto que o AIP interage diretamente com um número de

proteínas e, indiretamente, através dos três sistemas de chaperonas, com um número grande de outras proteínas (44).

Demonstramos que tanto a expressão de PDE4A4 quanto a de PDE4A8 foi diminuída em amostras de adenomas secretores de GH com diferentes mutação do AIP.

Para PDE4A8, mesmo não sendo encontrado na literatura possível interação com AIP, podemos observar que há diferenças na expressão dessa fosfodiesterase para cada mutação estudada. Para Q164* (c.490C>T) e F269_H275dup (c.805_825dup) observamos significativa diminuição de PDE4A8 em relação às células de hipófise normal. Já para a mutação R304* (c.910C>T) apresenta expressão semelhante às células normais e expressão diminuída em relação as células de GH de adenomas sem mutação. A mutação R304Q (c.911G>A) apresenta expressão semelhante às células de GH de adenomas sem mutação e expressão diminuída em relação as células normais. Essas diferenças de expressão sugerem que mutações do AIP podem reduzir potencialmente a expressão/estabilidade de PDE4A8, levando a uma alteração da via cAMP, embora uma possível interação não específica de PDE4A8 com AIP não possa ser descartada.

É bem descrito na literatura a interação entre PDE4A5 (forma análoga à PDE4A4 em humanos) e AIP (12, 26, 43, 44, 53). Sendo assim a demonstração celular da expressão dessa fosfodiesterase é de grande importância para o entendimento da tumorigênese hipofisária. Podemos observar a expressão semelhante de PDE4A4 tanto nas células normais como nas células com mutação F269_H275dup, R304* e E222* (c.622dupC), porém expressão diminuída em relação à células de GH de adenomas sem mutação. Já as mutações F269F (c.807C>T) e R304Q apresentam expressão aumentada em relação as células normais e semelhante aos adenomas sem mutação.

As mutações R304* e R304Q possuem mutação AIP *nonsense* e *missense* respectivamente. Em R304* a mutação provoca um enfraquecimento da ligação de

PDE4A5 e também perturba a ligação com AhR e no caso da mutação R304Q ocorre o enfraquecimento da ligação com PDE4A5, nas quais, a extremidade C-terminal do domínio TPR foi majoritariamente interrompida. Já a mutação de inserção F269_H275dup apesar de apresentar expressão significativamente diminuída de PDE4A4 não mostra ruptura de ligação com PDE4A5 (26). A mutação *nonsense* E222* apresenta expressão de PDE4A4 similar à células hipofisárias normais bem como nas mutações F269_H275dup e R304*, sugestivo de um possível distúrbio na interação AIP-PDE4A4. Quanto à mutação *splice site* F269F, a expressão de PDE4A4 significativamente maior que células normais demonstra que essa mutação, apesar de afetar a montagem do gene e essas anomalias perturbarem profundamente a estrutura da proteína, existe um efeito compensatório.

Assim como as mutações do AIP predispõem a adenomas e também prejudicam a capacidade de sua interação com PDE4A5 (12, 26), essa molécula que também interage com muitas outras proteínas, dentre elas: survivina e RET (54), ambas importantes proteínas de crescimento/regulação; receptor aril hidrocarbono – AhR; membros da via de sinalização G α i-2 e G α 1-3 (55); PRKAR1A (19); bem como Hsp90 e Hsp70, pode ter a ligação comprometida dependendo da mutação do gene AIP.

Existe na literatura um único estudo demonstrando que o efeito da expressão AIP sobre os níveis de cAMP não foi alterado pela a inibição geral de fosfodiesterases (IBMX) ou específica de PDE4 (Rolipram), bem como os níveis de secreção de GH pelas células também não foi alterado pelo uso desses inibidores (56). Porém, nesse estudo, o tipo celular utilizado não é de uma linhagem somatotrófica, tendo os estudos sido realizados *in vitro* e a concentração utilizada dos inibidores não foi relatada.

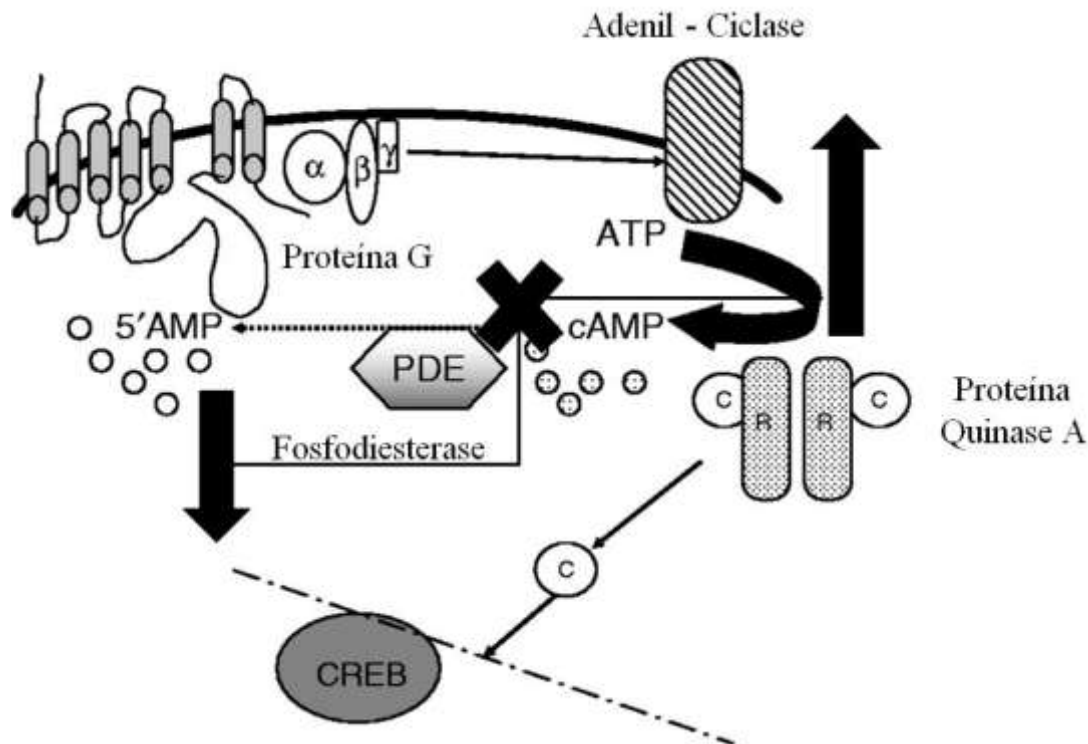


Figura 13 – O papel da fosfodiesterase na via do cAMP em tumores hipofisários com a mutação do AIP. O receptor acoplado à proteína G é ativado pelo hormônio produzido em excesso no adenoma secretor de GH, o que ocasiona em aumento da conversão de ATP em cAMP e consequente hiperativação da proteína quinase A. Essa cascata propicia a ativação da transcrição de genes específicos que exercem papel no crescimento e diferenciação celular, assim ocasionando o aumento de células no adenoma. Diferentemente do encontrado nos adenomas esporádicos, observamos que a expressões de PDEs nos adenomas com mutação do AIP é dependente do tipo de mutação do gene. Esse achado sugere que, dependendo da mutação, a interação entre AIP-PDE4A4 é comprometida (interrompida) em humanos, assim como demonstrado em animais, e consequentemente há a diminuição da expressão das fosfodiesterases. Abreviaturas: CREB - proteína de ligação ao elemento de resposta cAMP; cAMP – adenosina monofosfato cíclico; 5'-AMP – 5' adenosina monofosfato.

Conforme nosso estudo demonstra, o aumento na expressão de PDEs em tumores esporádicos pode ter papel contra regulatório, porém nos adenomas com mutações AIP, a expressão diminuída de fosfodiesterases em algumas mutações sugere que, para esses tumores, a compreensão do papel das PDEs na inativação de funções celulares possa contribuir para o desenvolvimento de novas drogas que visem PDE na hipófise, de forma semelhante ao que tem sido conseguido com êxito em outras doenças.

Sendo assim, devemos explorar e estudar cada vez mais a interação AIP - PDE4A4 nos tumores hipofisários, uma vez que essa interação específica desempenha um importante papel importante na atividade supressora de tumor do AIP. No entanto, podemos inferir que o aumento da expressão de PDE4A4 nos diferentes adenomas de hipófise possa ser uma resposta celular aos efeitos de perda da supressão do tumor de AIP nos adenomas.

É também possível que PDE4A4 e PDE4A8 (bem como outras isoformas de PDE4A ainda não demonstradas experimentalmente na hipófise) desempenhem um papel na formação do adenoma. Essa inferência é bem plausível visto que as mutações do AIP, em sua grande maioria, perturbam a interação com PDE4A4, que possui papel fundamental tanto na hipófise normal como nos adenomas. Do ponto de vista fisiológico, o AIP inibe a atividade enzimática de PDE4A4 e conseqüentemente ocorre o aumento dos níveis de cAMP, que assim ativa PKA. Sendo assim, a perda de função do AIP poderia aumentar a atividade de PDE4A4, os níveis de cAMP diminuiriam e regulariam negativamente a PKA. Dado que a ativação, em vez de inativação de PKA predispõe aos adenomas somatotróficos, é mais provável que o efeito das mutações de AIP em PDE4A4 gere uma resposta compensatória à tumorigênese, mais do que para promover a tumorigênese.

Finalmente, a desregulação de PDE4A4 e PDE4A8 aqui mostrado, abre um novo caminho para a tumorigênese hipofisária. Estes novos dados sugerem pela primeira vez que as duas isoformas apresentadas nesse estudo estão expressas no tecido da hipófise humana normal e que a sua expressão aumentada em tumores hipofisários é interrompida por várias mutações AIP, sugerindo um papel putativo desta isoforma na tumorigênese hipofisária, e possivelmente contribuindo para a perda de função do AIP observada em amostras de AIP mutantes.

Apesar de dados bem concretos, uma série de estudos adicionais ainda são necessários para avaliar melhor essa hiper expressão de PDEs nos adenomas hipofisários e também avaliar as diferentes expressões nas diversas mutações AIP.

REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

1. Guyton A, Hall J. *Tratado de Fisiologia Médica*. 6^a ed: Editora Elsevier; 2006.
2. Vierimaa O, Georgitsi M, Lehtonen R, Vahteristo P, Kokko A, Raitila A, et al. Pituitary adenoma predisposition caused by germline mutations in the AIP gene. *Science*. 2006;312(5777):1228-30.
3. Daly AF, Jaffrain-Rea ML, Ciccarelli A, Valdes-Socin H, Rohmer V, Tamburrano G, et al. Clinical characterization of familial isolated pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(9):3316-23.
4. Hall WA, Luciano MG, Doppman JL, Patronas NJ, Oldfield EH. Pituitary magnetic resonance imaging in normal human volunteers: occult adenomas in the general population. *Ann Intern Med*. 1994;120(10):817-20.
5. Ezzat S, Asa SL, Couldwell WT, Barr CE, Dodge WE, Vance ML, et al. The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review. *Cancer*. 2004;101(3):613-9.
6. Arafah BM, Nasrallah MP. Pituitary tumors: pathophysiology, clinical manifestations and management. *Endocr Relat Cancer*. 2001;8(4):287-305.
7. Gutenberg A, Larsen J, Lupi I, Rohde V, Caturegli P. A radiologic score to distinguish autoimmune hypophysitis from nonsecreting pituitary adenoma preoperatively. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2009;30(9):1766-72.
8. Pekic S, Stojanovic M, Popovic V. Contemporary issues in the evaluation and management of pituitary adenomas. *Minerva Endocrinol*. 2015.
9. Lania A, Mantovani G, Spada A. cAMP pathway and pituitary tumorigenesis. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2012;73(2):73-5.
10. Peverelli E, Mantovani G, Lania AG, Spada A. cAMP in the pituitary: an old messenger for multiple signals. *J Mol Endocrinol*. 2014;52(1):R67-77.
11. Vezzosi D, Bertherat J. Phosphodiesterases in endocrine physiology and disease. *Eur J Endocrinol*. 2011;165(2):177-88.
12. Leontiou CA, Gueorguiev M, van der Spuy J, Quinton R, Lolli F, Hassan S, et al. The role of the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene in familial and sporadic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(6):2390-401.
13. Mantovani G, Bondioni S, Ferrero S, Gamba B, Ferrante E, Peverelli E, et al. Effect of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate/protein kinase a pathway on markers of cell proliferation in nonfunctioning pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(12):6721-4.
14. Pertuit M, Barlier A, Enjalbert A, Gérard C. Signalling pathway alterations in pituitary adenomas: involvement of G α , cAMP and mitogen-activated protein kinases. *J Neuroendocrinol*. 2009;21(11):869-77.
15. Parma J, Duprez L, Van Sande J, Cochaux P, Gervy C, Mockel J, et al. Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas. *Nature*. 1993;365(6447):649-51.
16. Mancilla EE, De Luca F, Baron J. Activating mutations of the Ca²⁺-sensing receptor. *Mol Genet Metab*. 1998;64(3):198-204.
17. Weinstein LS, Shenker A, Gejman PV, Merino MJ, Friedman E, Spiegel AM. Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome. *N Engl J Med*. 1991;325(24):1688-95.
18. Vallar L, Spada A, Giannattasio G. Altered Gs and adenylate cyclase activity in human GH-secreting pituitary adenomas. *Nature*. 1987;330(6148):566-8.
19. Kirschner LS, Carney JA, Pack SD, Taymans SE, Giatzakis C, Cho YS, et al. Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I-alpha regulatory subunit in patients with the Carney complex. *Nat Genet*. 2000;26(1):89-92.
20. Bingham J, Sudarsanam S, Srinivasan S. Profiling human phosphodiesterase genes and splice isoforms. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;350(1):25-32.

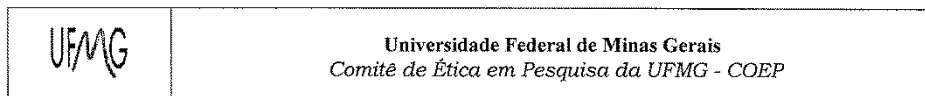
21. Mackenzie KF, Topping EC, Bugaj-Gaweda B, Deng C, Cheung YF, Olsen AE, et al. Human PDE4A8, a novel brain-expressed PDE4 cAMP-specific phosphodiesterase that has undergone rapid evolutionary change. *Biochem J.* 2008;411(2):361-9.
22. de Oliveira SK, Hoffmeister M, Gambaryan S, Müller-Esterl W, Guimaraes JA, Smolenski AP. Phosphodiesterase 2A forms a complex with the co-chaperone XAP2 and regulates nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem.* 2007;282(18):13656-63.
23. Persani L, Lania A, Alberti L, Romoli R, Mantovani G, Filetti S, et al. Induction of specific phosphodiesterase isoforms by constitutive activation of the cAMP pathway in autonomous thyroid adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(8):2872-8.
24. Persani L, Borgato S, Lania A, Filopanti M, Mantovani G, Conti M, et al. Relevant cAMP-specific phosphodiesterase isoforms in human pituitary: effect of Gs(alpha) mutations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(8):3795-800.
25. Bolger GB, Peden AH, Steele MR, MacKenzie C, McEwan DG, Wallace DA, et al. Attenuation of the activity of the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4A5 by interaction with the immunophilin XAP2. *J Biol Chem.* 2003;278(35):33351-63.
26. Igreja S, Chahal HS, King P, Bolger GB, Srirangalingam U, Guasti L, et al. Characterization of aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) mutations in familial isolated pituitary adenoma families. *Hum Mutat.* 2010;31(8):950-60.
27. Horvath A, Giatzakis C, Tsang K, Greene E, Osorio P, Boikos S, et al. A cAMP-specific phosphodiesterase (PDE8B) that is mutated in adrenal hyperplasia is expressed widely in human and mouse tissues: a novel PDE8B isoform in human adrenal cortex. *Eur J Hum Genet.* 2008;16(10):1245-53.
28. Arnaud-Lopez L, Usala G, Ceresini G, Mitchell BD, Pilia MG, Piras MG, et al. Phosphodiesterase 8B gene variants are associated with serum TSH levels and thyroid function. *Am J Hum Genet.* 2008;82(6):1270-80.
29. Libé R, Fratticci A, Coste J, Tissier F, Horvath A, Ragazzon B, et al. Phosphodiesterase 11A (PDE11A) and genetic predisposition to adrenocortical tumors. *Clin Cancer Res.* 2008;14(12):4016-24.
30. Libé R, Horvath A, Vezzosi D, Fratticci A, Coste J, Perlemoine K, et al. Frequent phosphodiesterase 11A gene (PDE11A) defects in patients with Carney complex (CNC) caused by PRKAR1A mutations: PDE11A may contribute to adrenal and testicular tumors in CNC as a modifier of the phenotype. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(1):E208-14.
31. Horvath A, Korde L, Greene MH, Libe R, Osorio P, Faucz FR, et al. Functional phosphodiesterase 11A mutations may modify the risk of familial and bilateral testicular germ cell tumors. *Cancer Res.* 2009;69(13):5301-6.
32. Conti M, Richter W, Mehats C, Livera G, Park JY, Jin C. Cyclic AMP-specific PDE4 phosphodiesterases as critical components of cyclic AMP signaling. *J Biol Chem.* 2003;278(8):5493-6.
33. Houslay MD, Sullivan M, Bolger GB. The multienzyme PDE4 cyclic adenosine monophosphate-specific phosphodiesterase family: intracellular targeting, regulation, and selective inhibition by compounds exerting anti-inflammatory and antidepressant actions. *Adv Pharmacol.* 1998;44:225-342.
34. Houslay MD, Adams DR. PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochem J.* 2003;370(Pt 1):1-18.

35. Beard MB, Olsen AE, Jones RE, Erdogan S, Houslay MD, Bolger GB. UCR1 and UCR2 domains unique to the cAMP-specific phosphodiesterase family form a discrete module via electrostatic interactions. *J Biol Chem.* 2000;275(14):10349-58.
36. Bolger GB, McPhee I, Houslay MD. Alternative splicing of cAMP-specific phosphodiesterase mRNA transcripts. Characterization of a novel tissue-specific isoform, RNPDE4A8. *J Biol Chem.* 1996;271(2):1065-71.
37. Bolger GB, Rodgers L, Riggs M. Differential CNS expression of alternative mRNA isoforms of the mammalian genes encoding cAMP-specific phosphodiesterases. *Gene.* 1994;149(2):237-44.
38. McPhee I, Cochran S, Houslay MD. The novel long PDE4A10 cyclic AMP phosphodiesterase shows a pattern of expression within brain that is distinct from the long PDE4A5 and short PDE4A1 isoforms. *Cell Signal.* 2001;13(12):911-8.
39. Bolger G, Michaeli T, Martins T, St John T, Steiner B, Rodgers L, et al. A family of human phosphodiesterases homologous to the dunce learning and memory gene product of *Drosophila melanogaster* are potential targets for antidepressant drugs. *Mol Cell Biol.* 1993;13(10):6558-71.
40. Huston E, Beard M, McCallum F, Pyne NJ, Vandenabeele P, Scotland G, et al. The cAMP-specific phosphodiesterase PDE4A5 is cleaved downstream of its SH3 interaction domain by caspase-3. Consequences for altered intracellular distribution. *J Biol Chem.* 2000;275(36):28063-74.
41. Beard MB, Huston E, Campbell L, Gall I, McPhee I, Yarwood S, et al. In addition to the SH3 binding region, multiple regions within the N-terminal noncatalytic portion of the cAMP-specific phosphodiesterase, PDE4A5, contribute to its intracellular targeting. *Cell Signal.* 2002;14(5):453-65.
42. Kuzhandaivelu N, Cong YS, Inouye C, Yang WM, Seto E. XAP2, a novel hepatitis B virus X-associated protein that inhibits X transactivation. *Nucleic Acids Res.* 1996;24(23):4741-50.
43. Morgan RM, Hernández-Ramírez LC, Trivellin G, Zhou L, Roe SM, Korbonits M, et al. Structure of the TPR domain of AIP: lack of client protein interaction with the C-terminal α -7 helix of the TPR domain of AIP is sufficient for pituitary adenoma predisposition. *PLoS One.* 2012;7(12):e53339.
44. Trivellin G, Korbonits M. AIP and its interacting partners. *J Endocrinol.* 2011;210(2):137-55.
45. Meyer BK, Petrusis JR, Perdew GH. Aryl hydrocarbon (Ah) receptor levels are selectively modulated by hsp90-associated immunophilin homolog XAP2. *Cell Stress Chaperones.* 2000;5(3):243-54.
46. Beckers A, Aaltonen LA, Daly AF, Karhu A. Familial isolated pituitary adenomas (FIPA) and the pituitary adenoma predisposition due to mutations in the aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) gene. *Endocr Rev.* 2013;34(2):239-77.
47. Ribeiro-Oliveira A, Franchi G, Kola B, Dalino P, Pinheiro SV, Salahuddin N, et al. Protein western array analysis in human pituitary tumours: insights and limitations. *Endocr Relat Cancer.* 2008;15(4):1099-114.
48. Maurice DH, Ke H, Ahmad F, Wang Y, Chung J, Manganiello VC. Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(4):290-314.
49. Conti M, Beavo J. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu Rev Biochem.* 2007;76:481-511.
50. Houslay MD. Underpinning compartmentalised cAMP signalling through targeted cAMP breakdown. *Trends Biochem Sci.* 2010;35(2):91-100.

51. Chahal HS, Chapple JP, Frohman LA, Grossman AB, Korbonits M. Clinical, genetic and molecular characterization of patients with familial isolated pituitary adenomas (FIPA). *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21(7):419-27.
52. Ozfirat Z, Korbonits M. AIP gene and familial isolated pituitary adenomas. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;326(1-2):71-9.
53. MacKenzie KF, Wallace DA, Hill EV, Anthony DF, Henderson DJ, Houslay DM, et al. Phosphorylation of cAMP-specific PDE4A5 (phosphodiesterase-4A5) by MK2 (MAPKAPK2) attenuates its activation through protein kinase A phosphorylation. *Biochem J.* 2011;435(3):755-69.
54. Vargiolu M, Fusco D, Kurelac I, Dirnberger D, Baumeister R, Morra I, et al. The tyrosine kinase receptor RET interacts in vivo with aryl hydrocarbon receptor-interacting protein to alter survivin availability. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(7):2571-8.
55. Tuominen I, Heliövaara E, Raitila A, Rautiainen MR, Mehine M, Katainen R, et al. AIP inactivation leads to pituitary tumorigenesis through defective G α i-cAMP signaling. *Oncogene.* 2015;34(9):1174-84.
56. Formosa R, Xuereb-Anastasi A, Vassallo J. Aip regulates cAMP signalling and GH secretion in GH3 cells. *Endocr Relat Cancer.* 2013;20(4):495-505.

ANEXO I

Carta de Aprovação do Comitê de Ética



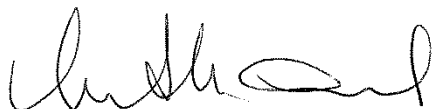
Parecer nº. ETIC 404/07

**Interessado(a): Prof. Antônio Ribeiro de Oliveira Júnior
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina-UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 27 de novembro de 2007, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação dos marcadores de proliferação celular KI-67 e P53 quanto a sua utilidade no seguimento de tumores de hipófise não secretores e craniofaringiomas**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.



**Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG**

Carta de Aprovação do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 43738914.4.0000.5149

Interessado(a): Prof. Antonio Ribeiro de Oliveira Junior
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina- UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 06 de maio de 2015, o projeto de pesquisa intitulado "**O papel das fosfodiesterases e sua importância para interação com o receptor AIP (proteína com interação com receptor ARIL hidrocarbono) em tumores hipofisários**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto através da Plataforma Brasil.

Prof. Dra. Telma Campos Medeiros Lorentz
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO II

cAMP-specific PDE4 phosphodiesterases and AIP in the pathogenesis of pituitary tumors

Graeme B Bolger^{1,2}, Mariana F Bizzi³, Sergio V Pinheiro⁴, Giampaolo Trivellini⁵, Lisa Smoot¹, Mary-Ann Accavitti⁶, Márta Korbonits^{5,*} and Antonio Ribeiro-Oliveira Jr^{5,*}

¹Department of Medicine, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama, USA

²Department of Pharmacology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama, USA

³Department of Internal Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

⁴Department of Pediatrics, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

⁵Center for Endocrinology, William Harvey Research Institute, Barts and The London School of

Medicine, Queen Mary University of London, London, UK

⁶Department of Microbiology and Immunology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama, USA

*M Korbonits and A Ribeiro-Oliveira Jr contributed equally to this work

Correspondence should be addressed to G B Bolger
Email: gbbolger@uab.edu

Abstract

PDE4 cyclic nucleotide phosphodiesterases regulate cAMP abundance in cells and therefore regulate numerous processes, including cell growth and differentiation. The rat PDE4A5 isoform (human homolog PDE4A4) interacts with the AIP protein (also called XAP2 or ARA-9). Germline mutations in AIP occur in approximately 20% of patients with Familial Isolated Pituitary Adenoma (FIPA) and 20% of childhood-onset simplex somatotroph adenomas. We therefore examined the protein expression of PDE4A4 and the closely related isoform PDE4A8 in normal human pituitary tissue and in pituitary adenomas. PDE4A4 had low expression in normal pituitary but was significantly overexpressed in somatotroph, lactotroph, corticotroph and clinically nonfunctioning gonadotroph adenomas ($P < 0.0001$ for all subtypes). Likewise, PDE4A8 was expressed in normal pituitary and was also significantly overexpressed in the adenoma subtypes ($P < 0.0001$ for all). Among the different adenoma subtypes, corticotroph and lactotroph adenomas were the highest and lowest expressed for PDE4A4, respectively, whereas the opposite was observed for PDE4A8. Naturally occurring oncogenic variants in AIP were shown by a two-hybrid assay to disrupt the ability of AIP to interact with PDE4A5. A reverse two-hybrid screen identified numerous additional variants in the tetratricopeptide repeat (TPR) region of AIP that also disrupted its ability to interact with PDE4A5. The expression of PDE4A4 and PDE4A8 in normal pituitary, their increased expression in adenomatous pituitary cells where AIP is meant to participate, and the disruption of the PDE4A4–AIP interaction by AIP mutants may play a role in pituitary tumorigenesis.

Key Words

- ▶ pituitary adenomas
- ▶ phosphodiesterases
- ▶ FIPA
- ▶ AIP
- ▶ cAMP
- ▶ PKA
- ▶ PDE4A8
- ▶ PDE4A4
- ▶ PDE4A5

Endocrine-Related Cancer
(2016) 23, 419–431

Introduction

The PDE4 enzymes are members of a large superfamily of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) that enzymatically break down the 'second messengers' cAMP

and/or cGMP and therefore regulate their abundance in cells (Bolger *et al.* 2007, Francis *et al.* 2011). cAMP signaling pathways, working through spatially distinct

subpopulations of the cAMP effectors, the cAMP-dependent protein kinase A (PKA) and the exchange protein activated by cAMP (Epac), differentially regulate a large range of distinct intracellular processes (Francis *et al.* 2011, Maurice *et al.* 2014). PDE4 enzymes are differentiated from other members of the PDE superfamily (PDE1 through PDE11, respectively), by their specificity for cAMP and by their ability to be inhibited by a class of highly selective inhibitors.

There are at least 20 different PDE4 isoforms in humans (Bolger 2007), which differ in their structure, pattern of expression in tissues and interactions with specific proteins. They are encoded by four genes (*PDE4A*, *PDE4B*, *PDE4C*, and *PDE4D*), with additional diversity produced by alternative mRNA splicing and the use of promoters unique to each isoform (Bolger 2007, Bolger *et al.* 2007). PDE4A5 (known as PDE4A4 in humans) is a well-studied PDE4 isoform that interacts with several proteins and has a number of characteristic biochemical properties (Bolger *et al.* 1993, 1994, Christian *et al.* 2010). An important and apparently unique property of rat PDE4A5, compared with other rodent PDE4 isoforms, is that it interacts selectively with the AIP protein, a member of the immunophilin family of proteins (Bolger *et al.* 2003b). The AIP protein interacts with PDE4A5 largely through its tetratricopeptide (TPR) domain (Bolger *et al.* 2003b, Igreja *et al.* 2010, Morgan *et al.* 2012), which is a well-characterized protein–protein interaction domain found on many proteins (Kinoshita *et al.* 1990, Sikorski *et al.* 1990) and which is often disrupted in patients with AIP mutations (Igreja *et al.* 2010). The interaction of AIP with PDE4A5 changes the enzymatic activity of PDE4A5 and also its ability to be inhibited by PDE4-selective inhibitors (Bolger *et al.* 2003b).

Mutations in genes encoding components of cAMP pathways have been implicated in the predisposition to several endocrine neoplasms and related disorders (Stratakis 2013, for a review). Germline mutations in the gene encoding the regulatory subunit type 1- α of PKA (*PRKARIA*) produce the multiple neoplasia, myxoma and lentiginosis syndrome Carney complex (Horvath *et al.* 2010). Germline mutations in the PKA catalytic subunit can produce adrenal cortical adenomas (*PRKACA*), (Beuschlein *et al.* 2014) or Carney complex (*PRKACB*) (Forlino *et al.* 2014). Mosaic somatic mutations in the gene encoding the G-protein alpha subunit (*GNAS*), which regulates adenylyl cyclase, the enzyme that synthesizes cAMP, cause McCune–Albright syndrome, characterized by fibrous dysplasia of bone, café-au-lait nodules, and precocious puberty (Salpea & Stratakis 2014), whereas

somatic mutations can also be detected in 30–40% of somatotroph adenomas (Landis *et al.* 1989). Recently, microduplications in the G-protein-coupled orphan receptor GPR101, which activates adenylyl cyclase and therefore cAMP signaling, have been implicated in a disorder with very young-onset gigantism (Trivellin *et al.* 2014). These genetic syndromes implicate cAMP signaling in pituitary tumor pathogenesis and provide a rationale for study of additional cAMP signaling components in this process.

Germline mutations in the *AIP* gene are present in approximately 20% of patients with familial isolated pituitary adenoma (FIPA). The *AIP* mutation-positive patients have a characteristic clinical phenotype with usually young- or childhood-onset growth hormone (GH) and/or prolactin (PRL)-secreting adenomas and can be seen in cases with no apparent family history as well (Vierimaa *et al.* 2006, Daly *et al.* 2007, Leontiou *et al.* 2008, Heliovaara *et al.* 2009, Igreja *et al.* 2010, Gadelha *et al.* 2013, Beckers *et al.* 2013). AIP is expressed in the pituitary, and many pathogenic AIP variants block its interaction with PDE4A5 (Vierimaa *et al.* 2006, Leontiou *et al.* 2008, Igreja *et al.* 2010, Bolger *et al.* 2003b). Furthermore, impaired function of AIP in the pituitary attenuates cAMP signaling (Formosa *et al.* 2013, Formosa & Vassallo 2014, Tuominen *et al.* 2015).

Given the role of both cAMP signaling and AIP in the pathogenesis of pituitary tumors, we wished to explore further the potential role of the PDE4A5–AIP interaction in pituitary tumorigenesis. Therefore, an important aim of the current studies was to demonstrate that PDE4A4 is expressed in normal pituitary and in pituitary adenomas, where it is available for interaction with AIP. We had shown previously that mRNA encoding PDE4A4 and its rat/mouse ortholog, PDE4A5, is expressed in a number of tissues, including the brain (Bolger *et al.* 1994, 1996), but there was no data on its expression in the pituitary. We have been particularly interested in the tissue-specific expression of PDE4A8, an isoform encoded by the *PDE4A* gene that has undergone rapid evolutionary change (Mackenzie *et al.* 2008). Human PDE4A8 differs from its rodent counterpart almost exclusively at its alternatively spliced amino-terminus and related 5' genomic sequences, which are likely to control its tissue expression (Bolger *et al.* 1996, Mackenzie *et al.* 2008). Here we study PDE4A4 and PDE4A8 protein expression in normal pituitary and in pituitary adenomas using novel specific antibodies. We also identify additional variants in AIP that affect its ability to interact with PDE4A5.

Materials and methods

Tissue specimens

Samples from pituitary adenomas were removed at transsphenoidal surgery. The tumor type was determined on the basis of clinical and biochemical findings before surgery and immunohistochemical determination of the expressed pituitary hormones: for the adenoma samples, all slides utilized showed more than 90% of the specific tumor, as confirmed by hematoxylin and eosin. Autopsy pituitary samples were collected within 24 h of death from patients with no evidence of any endocrine abnormality. Consecutive cuts were prepared for histological analysis from normal pituitary tissue and different types of pituitary adenomas. Informed consent was obtained from all pituitary patients, and the protocol was approved by the Institutional Research Ethics Committee.

PDE4 antibodies

The mouse monoclonal antibody 4A4-1, specific to human PDE4A4, was generated specifically for this study against the peptide sequence SAERAERERQPHRPIERADA (Fig. 1), corresponding to the unique amino-terminal region of PDE4A4 amino acids 51 through 70 in both human PDE4A4 (GenBank Accession number L2096S.1) and rat PDE4A5 (GenBank L27057.1, Fig. 1) (Bolger *et al.* 1993, 1994, Mackenzie *et al.* 2008). The rabbit polyclonal

antibody 7233 specific to human PDE4A8 was described previously (Mackenzie *et al.* 2008). The mouse monoclonal antibody 4E1.16, specific for human PDE4A8, was generated to the same peptide as the polyclonal antibody, of the sequence KGDERSRETPESTRAN, corresponding to the unique amino-terminal region of PDE4A8 (GenBank AYS93872, (Mackenzie *et al.* 2008)). All monoclonal antibodies were purified by limiting dilution and then grown in culture. Antibodies were then purified from culture supernatants with a protein G-affinity matrix (Pierce, Thermo Fisher Scientific).

Immunoblotting

COS7 cells were transfected with the plasmid pcDNAN46VSV to express human PDE4A4, or with pcDNA4A8VSV to express human PDE4A8, or with vector pcDNA3 (Life Technologies), using methods that we have described previously (McPhee *et al.* 1999, Mackenzie *et al.* 2008, Christian *et al.* 2010). The proteins were engineered to contain a vesicular stomatitis virus (VSV) epitope at their carboxy terminus. Extracts from the cells were prepared using methods that we have described previously (McPhee *et al.* 1999, Mackenzie *et al.* 2008, Christian *et al.* 2010) and were analyzed by LDS-PAGE (Novex, Life Technologies) and immunoblotting with either an antibody to VSV (Sigma) (Kreis 1986) or the monoclonal antibody of interest.

Human PDE4A4 and Rat PDE4A5, with AIP interaction sites

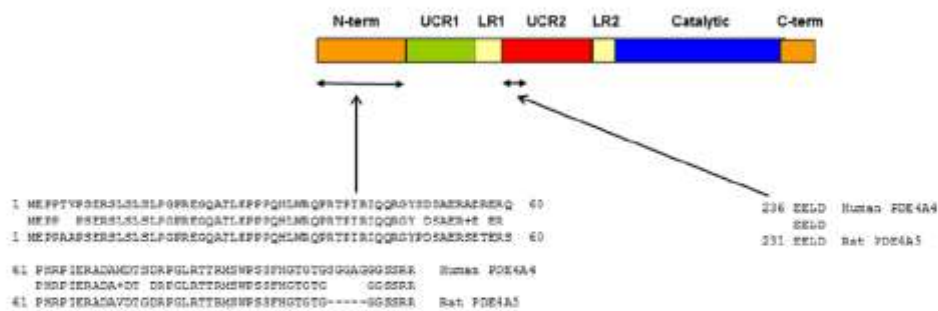


Figure 1

Human PDE4A4 and rat PDE4A5 with AIP interaction sites. Schematic representation of the human PDE4A4 protein structure. The human PDE4A4 consists of a unique amino-terminal region, upstream conserved regions 1 and 2 (UCR1 and UCR2) separated by linker regions 1 and 2 (LR1 and LR2), a catalytic domain, and the unique carboxyl-terminal region. The domain structure of rat PDE4A5 is identical. The amino acid sequences of the human PDE4A4 and rat PDE4A5 are shown on the specific regions implicated in the interaction of PDE4A5 with AIP: the unique N-terminal region and the EELD motif located at the beginning of UCR2. The middle row of amino acids shows the high identity of these conserved regions between the two species. The sequence SAERAERERQPHRPIERADA was used to generate a new PDE4A5/PDE4A4 antibody.

For this purpose, samples were run in parallel lanes on the same gel and then transferred to a single filter. For immunoblotting, the filter was then cut in half, and each half was incubated with the appropriate antibody; after washing, the two halves were rejoined for image generation with enhanced chemiluminescence (ECL), generating a single image with both antibodies. Primary antibody incubations (1:500 for PDE4A4 and PDE4A8 and 1:5000 for VSV) were performed for 1 h in Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20, followed by two washes in the same buffer. Secondary antibody incubations (SC-5099, 1:10,000; Santa Cruz Biotechnology) were performed in the same buffer, followed by two washes in the same buffer. Signal development was with ECL (Pierce, Thermo Fisher Scientific).

Immunofluorescent staining and confocal microscopy

We performed confocal immunofluorescence analysis of somatotroph, corticotroph, lactotroph, and clinically nonfunctioning gonadotroph adenomas as well as normal pituitary tissue. Normal pituitary architecture was evaluated by reticulin staining. After deparaffinization and hydrating procedures, the slides were transferred into 400 mL of prewarmed (94–96°C) target retrieval solution (40 mL of stock into 360 mL water; Dako) in a glass container in a water bath. The sections were incubated in blocking solution (1% BSA and 0.1% Tween 20) at room temperature for 1 h and then incubated overnight at 4°C with one of the primary antibodies. The mouse monoclonal antibody 4A4-1 was used for all PDE4A4 comparisons, whereas the mouse monoclonal 4E1.16 was used for all PDE4A8 comparisons. In order to colocalize the selected proteins in different cells, polyclonal goat anti-GH (L20, 1:50; Santa Cruz Biotechnology), polyclonal goat anti-ACTH (P-12, 1:50; Santa Cruz Biotechnology), polyclonal rabbit anti-follicle-stimulating hormone (FSH) (87461:25; Abcam) or polyclonal mouse anti-FSH (C10, 1:25; Dako), and polyclonal goat anti-PRL (C-17, 1:50; Santa Cruz Biotechnology) or polyclonal rabbit anti-PRL (1:50; Dako), with one of the PDE4A4- or PDE4A8-specific antibodies described previously, were also added to the incubation buffer. After an overnight incubation, slides were rinsed five times in PBS and then incubated for 1 h in the dark at room temperature with anti-goat Alexa 546 (1:100; Life Technologies), anti-rabbit Alexa 546 (1:50, 1:100, or 1:200; Life Technologies), anti-mouse DyLight 488 (1:50, 1:200, or 1:400; Pierce, Thermo Fisher Scientific), anti-goat Alexa 488 (1:100; Life Technologies) or anti-mouse Alexa 546 (1:200; Life Technologies),

according to the primary antibodies previously used. Due to a change of PRL antibody used in our university hospital from goat to rabbit anti-PRL, secondary antibodies used in PRL experiments for the isoform PD4A8 had to be altered in order to reach the expected double labeling. Following washes with PBS, sections were mounted in 90% glycerol/10% Tris 1M, and images were captured through confocal microscope (Leica TCS SP5; Leica), 63× objective, and 630× original magnification. All confocal settings were determined at the beginning of the imaging session and remained unchanged. For quantitative analysis, images were captured at 8 bits and analyzed in gray scale, using the protocol we have published previously (Ribeiro-Oliveira Jr et al. 2008). Briefly, three different normal pituitary samples and four to seven distinct samples of each adenoma subtype were analyzed. Three to four images were captured randomly from each sample and three measurements were obtained for each image, with about 30–50 cells also chosen randomly in each analyzed sample. ImageJ (the National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) software was used to quantify fluorescence intensity and area intensity, as well as the area of each individual cell. The background fluorescence and the energy intensity threshold were then subtracted from the region of interest in the same level for all examined pictures. The relative fluorescence corresponded to the unit 'gray level', varying from 0 (black) to 255 (white), as an average of the area for each cell (the sum of gray value of all pixels divided by the number of pixels/area).

Two-hybrid analysis of protein–protein interactions

The effect of variants in AIP on its interaction with PDE4A5 was studied by the yeast two-hybrid system, as described previously (Bolger et al. 2003b, Leontiou et al. 2008, Igreja et al. 2010). For these studies, PDE4A5 was cloned into the *NotI*-site of pLEXAN, to generate a LexA DNA-binding domain fusion (i.e., the plasmid pLEXAR6). Wild-type (WT) AIP and various missense AIP sequence variants were cloned into the *NotI*-site of pGADN, to generate GAL4 activation domain fusions (i.e., the plasmid pGADNRB3 and mutants thereof). Site-directed mutagenesis was performed using the circular mutagenesis method (Weiner et al. 1994), and all mutants were verified by sequencing before use. Quantitative β -galactosidase assays were performed in the *Saccharomyces cerevisiae* strain L40 by the method of Guarente (Guarente 1983) using *O*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside as a substrate. Each variant was tested in at least two different yeast clones.

'Reverse' two-hybrid analysis

This was performed essentially as we have described previously for a different interaction (Steele *et al.* 2001). The plasmid pGADNRB3Sma was generated by site-directed mutagenesis of pGADNRB3. It encodes the full open reading frame of *AIP*, cloned into the *NotI* site of pGADN (Bolger *et al.* 2003b), with a *SmaI* site engineered at codon 168. The generation of this site created a variant (W168G) in *AIP* that had no effect on its ability to interact with PDE4A5 in two-hybrid assays (data not shown). To mutagenize the *AIP* TPR homology region (Bolger *et al.* 2003b), PCR primers were synthesized that amplified codons 168–330 of *AIP*, with some vector sequences at the 3' end of the insert. The PCR product overlapped approximately 30 nucleotides at each end with *SmaI*-cut pGADNRB3Sma DNA. Therefore, cotransformation of *S. cerevisiae* L40 with the PCR product and *SmaI*-cut pGADNRB3Sma DNA efficiently generated full-length GADNRB3Sma with PCR-generated *AIP* TPRs, by the use of recombination *in vivo*. The PCRs were designed to introduce a single-nucleotide substitution, on average, in the PCR product and used 25 U/mL of Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) in 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.2 mM dATP, 0.4 mM of each of dCTP, dTTP, and dGTP, 1 µg/mL of pGADNRB3Sma and each PCR primer at 1 nM/mL. Ten separate PCRs, each 100 µL, were performed for 25 cycles with an annealing temperature of 55°C. The PCR products were pooled and 20 µL were mixed with 50 ng of *SmaI*-cut pGADNRB3Sma DNA and transformed into *S. cerevisiae* strain L40 containing pLEXAR6. Colonies containing both plasmids were selected by their ability to grow in the absence of tryptophan and leucine, replica-plated onto nylon filters, and subjected to a filter β-galactosidase assay (Bolger 1998). The pGADNRB3Sma mutant plasmids were isolated from white colonies (i.e., those lacking β-galactosidase activity) by their ability to complement the *leuII*-genotype of *Escherichia coli* strain LB101. The PCR-generated region of the resulting plasmids was then sequenced with an ABI 3700 sequencer (Applied Biosystems).

Characterization of *AIP* variants

Three public databases were interrogated to check for the allele frequencies of the *AIP* variants tested in this study: the 1000 Genomes Project (Abecasis *et al.* 2012); the Exome Variant Server (EVS), NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA, USA (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) (accessed on March 2016); and the Exome Aggregation Consortium (ExAC), Cambridge, MA, USA (<http://exac.broadinstitute.org>) (accessed on 1 March 2016).

Statistical analysis

Variables were first checked for normal distribution through the Shapiro–Wilk test. The immunofluorescence data comparing each adenoma subtype with normal pituitary tissue were tested for statistical significance with the nonparametric Mann–Whitney *U* test, using GraphPad Prism 6.0 (GraphPad). Different adenoma subtypes were compared through Kruskal–Wallis followed by Dunn's multiple comparisons test. Quantitative β-galactosidase assays were analyzed by unpaired *t*-test (SigmaPlot; Systat, San Diego, CA, USA). Significance was taken as *P* < 0.05. Data are shown as mean ± S.E.M. OF S.D.

Results

PDE4A4 is specifically expressed in pituitary adenomas

As the rodent homolog of PDE4A4 interacts with *AIP* (Bolger *et al.* 2003b), we wished to determine PDE4A4 distribution in normal human pituitary cells and adenomas (Fig. 2). For this study, we developed a monoclonal antibody, 4A4-1, specific for PDE4A4 (and also PDE4A5). Immunoblotting of protein extracted from cells transfected with PDE4A4 shows a band with a relative molecular mobility of 125 ± 3 kDa, as shown previously (Mackenzie *et al.* 2008). Immunofluorescence of normal pituitary showed that PDE4A4 is present in GH and FSH cells, with very low expression in PRL or ACTH cells. However, we detected a significantly higher expression of PDE4A4 in GH-, PRL- or ACTH-secreting pituitary adenomas, as well as FSH-positive non-functioning pituitary adenomas (NFPAs), compared with the corresponding cell type in normal pituitary (Fig. 2). By contrast, we did not see any expression in fat tissue, which was used here as a negative control.

PDE4A8 is expressed in normal pituitary cells and adenomas

We had previously developed a polyclonal antibody to PDE4A8 and used it to demonstrate its expression in several regions of the CNS (Mackenzie *et al.* 2008). For this study, we have developed a monoclonal antibody, 4E1.16, which has the same specificity as the polyclonal antibody (see 'Materials and methods' section for details) and used immunofluorescence to determine its expression in pituitary tissue (Fig. 3). The 4E1.16 antibody detected a protein of the correct size on immunoblotting of cells transfected to express PDE4A8.

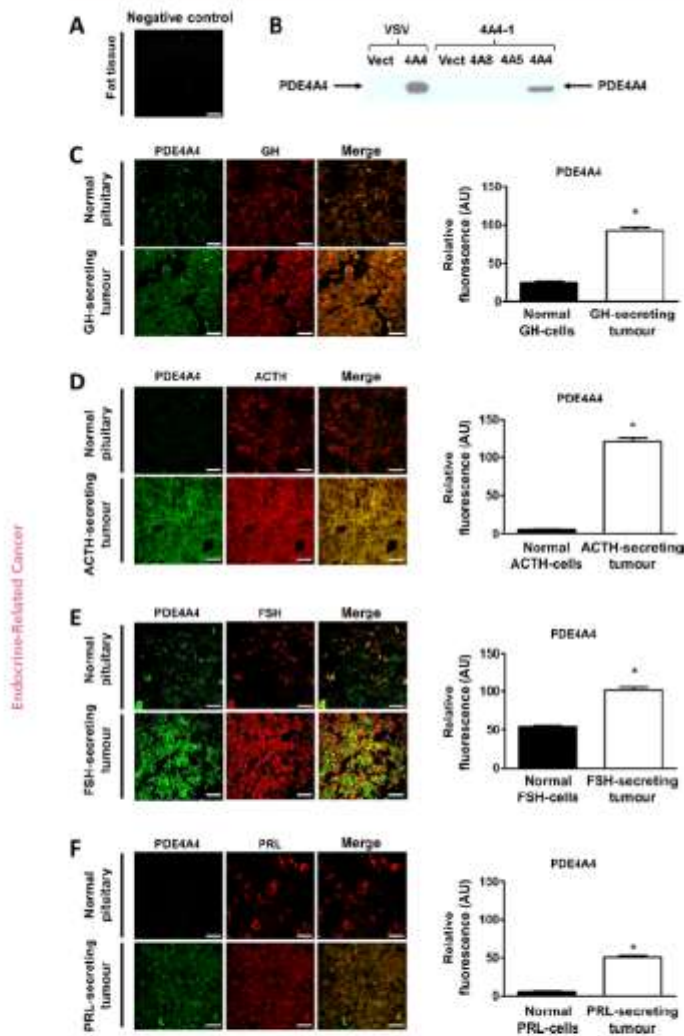


Figure 2 Localization of PDE4A4 in the pituitary. (A) Immunofluorescence with the 4A4-1 antibody in fat tissue, as a negative control. (B) Immunoblotting with the 4A4-1 antibody. COS7 cells were transfected to express human PDE4A4 (4A4) or vector (Vect). All PDE constructs also encoded a VSV epitope at the carboxyl-terminus of the protein. LDS-PAGE and immunoblotting with an antibody against VSV, or with 4A4-1, were performed as described in the 'Materials and methods' section. The PDE4A4 protein migrated at 97 kDa. (C, D, E and F) Double immunofluorescent staining using monoclonal 4A4-1 (green staining) and polyclonal GH, ACTH, FSH, or PRL (red staining) antibodies in normal pituitary ($N=3$), and in GH-, ACTH-, FSH- (NFPA), and PRL-secreting adenomas ($N=4-7$ for each adenoma subtype; C, D, E, and F, respectively). The bar graphs to the right of each panel provide semiquantification of the relative fluorescence of PDE4A4 in each adenoma type, compared with its respective normal cell. Scale bar = 25 μ m. All data are shown as mean \pm S.E.M.; AU, arbitrary units; * $P < 0.0001$.

Endocrine-Related Cancer

Immunofluorescence of normal pituitary showed that PDE4A8 was present in all cell types, with somewhat lower expression in ACTH cells. In pituitary adenomas, PDE4A8 was expressed at significantly higher levels, in all subtypes (Fig. 3). We did not see any expression of PDE4A8 with this antibody in control tissues, such as fat tissue, consistent with results obtained previously with the polyclonal antibody (Mackenzie *et al.* 2008).

Differences among different adenoma subtypes for PDE4A4 and PDE4A8

When different adenoma subtypes were compared for PDE4A4 (Fig. 4A), this isoform was significantly reduced in prolactinomas compared with the other adenoma subtypes (Fig. 4A). However, PDE4A4 abundance in corticotrophinomas was significantly

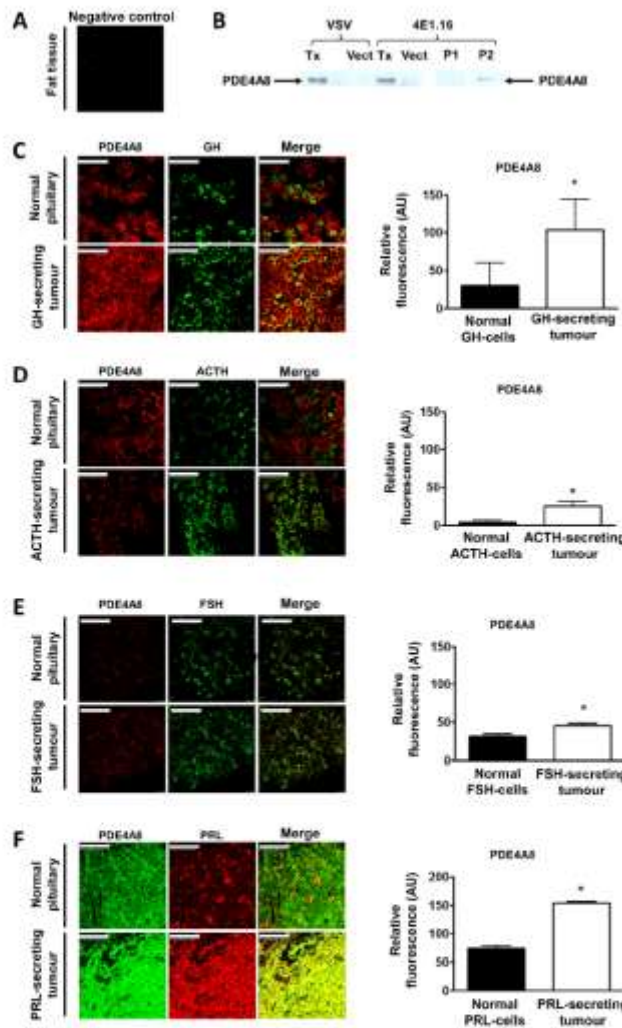


Figure 3 Localization of PDE4A8 in the pituitary. (A) Immunofluorescence with the 4E1.16 antibody in fat tissue, as a negative control. (B) Immunoblotting with the 4E1.16 antibody. Extracts from COS7 cells transfected to express PDE4A8-VSV or with vector (Vect) were immunoblotted with an antibody against VSV or with 4E1.16. On separate gels, PDE4A8-VSV extracts were immunoblotted with 4E1.16 and the peptide used as immunogen (P1), or an unrelated peptide (P2). All methods were otherwise as for Fig. 2B. The PDE4A8 protein migrates at 102 kDa. (C, D and E) Double immunofluorescent staining using monoclonal 4E1.16 (red staining) and polyclonal GH, ACTH, and FSH (green staining) antibodies in normal pituitary ($N=3$) and GH- and ACTH-secreting adenomas and NFPAs ($N=4-7$ for each adenoma subtype; C, D, and E, respectively). (F) Double immunofluorescent staining using monoclonal 4E1.16 (green staining) and polyclonal PRL (red staining) in normal pituitary ($N=3$) and PRL-secreting adenomas ($N=5$). The bar graphs to the right of each panel provide quantitation of the relative fluorescence of PDE4A8 in each adenoma type, compared with its respective normal cell. Scale bar = 75 μ m. All data are shown as mean \pm s.e.m.; AU, arbitrary units; * $P < 0.0001$.

increased compared with the other adenoma subtypes (Fig. 4A).

For the PDE4A8 isoform, in turn, prolactinomas showed significantly higher PDE4A8 expression than the other adenoma subtypes (Fig. 4B), whereas corticotrophinomas showed the lowest abundance of PDE4A8 (Fig. 4B).

Disease-associated variants in AIP attenuate its interaction with PDE4A5

AIP interacts specifically with PDE4A5 (Bolger *et al.* 2003b) and mutations in AIP that are associated with FIPA attenuate this interaction (Leontiou *et al.* 2008, Igreja *et al.* 2010). A yeast two-hybrid quantitative β -galactosidase assay can rapidly and conveniently assess the effects of

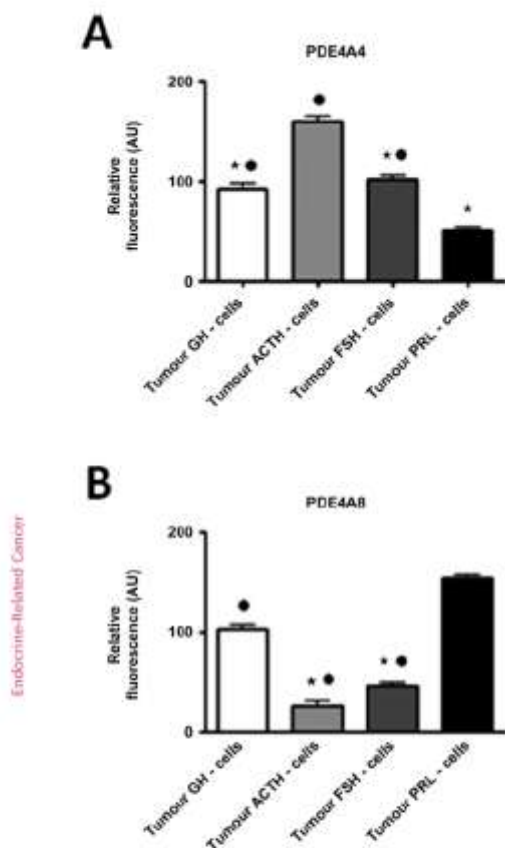


Figure 4 Comparison of PDE4A4 and PDE4A8 immunostaining in pituitary adenomas. (A) PDE4A4 expression in pituitary adenoma subtypes. All data are shown as mean \pm S.E.M.; AU, arbitrary units; * $P < 0.0001$ compared with corticotroph adenomas and $P < 0.0001$ compared with lactotroph adenomas. (B) PDE4A8 expression in pituitary adenoma subtypes. All data are shown as mean \pm S.E.M.; AU, arbitrary units; * $P < 0.0001$ compared with corticotroph adenomas and $P < 0.0001$ compared with lactotroph adenomas.

AIP variants on its interaction with PDE4A5, which in turn can inform about the possible pathogenicity of *AIP* variants. In this study, we analyzed/reanalyzed a large number of disease-associated *AIP* variants, including six variants that we have not reported with this assay previously (Leontiou *et al.* 2008, Igreja *et al.* 2010),

and found that attenuation of interaction generally correlated with the disease phenotype (Fig. 5). The new and previously studied single amino acid substitutions or deletions (C238Y, R271W, Y248del, and V291M) and the truncation mutations (R81*, Q164*, Q217*, and R304*), all of which are strongly disease associated, completely ablate the interaction (Fig. 5). We also saw ablation, but with borderline statistical significance, by the K241E and R304Q missense variants, which are also felt to be disease associated. The I257V and A299V variants, which are predicted to be unlikely to be pathogenic and have uncertain clinical significance, showed no clear difference. Conversely, the R16H and V49M missense variants, which are generally considered to be rare SNPs (Igreja *et al.* 2010), and are located outside the TPRs, have no effect, or have only a weak effect on the interaction (Fig. 5). Two apparently disease-causing variants, K103R and Δ G23/E24, have no clear inhibitory effect or may augment the interaction, as measured by this assay (Fig. 5). K103R is, however, a conservative substitution, and both K103R and Δ G23/E24 are located outside the TPRs, which are considered to mediate its interaction with PDE4A5 (Table 1).

Isolation of additional variants in the *AIP* TPRs

The *AIP* TPRs form a close association with two different regions of PDE4A5 (Bolger *et al.* 2003b). Given this close association, it seems unlikely that all the amino acids in the TPRs that are essential for this interaction have been identified in the analyses performed to date. These amino acids would also be potential sites of disease-associated variants. To identify such amino acids, we performed random mutagenesis of the *AIP* TPRs and then used two-hybrid approaches to select and identify variants that attenuated the *AIP*-PDE4A5 interaction. This approach, typically called 'reverse two-hybrid', has successfully been used to characterize many protein-protein interactions. With this screen, we identified seven single amino acid variants (K175E, C208R, N236H, C254R, H275L, L306P and L309P) and one double variant (W223R/V250A) in the *AIP* TPRs that strongly attenuated their ability to interact with PDE4A5 (Fig. 5). Intriguingly, one of these variants, C254R, has been recently identified as a disease-associated mutation in a patient with gigantism: this female patient was diagnosed at the age of 14 years due to tall stature (184 cm, midparental height 161.5 cm) and primary amenorrhea and had a large (46 \times 44 \times 31 mm) GH- and PRL-secreting macroadenomas causing hydrocephalus. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) was 5 \times and PRL was

Table 1 Reported AIP variants tested in this study.

DNA change	Protein change	SNP id	Control MAF – EVS	Control MAF – ExAC	Control MAF – 1000 Genomes Project
c.47G>A	p.R16H	rs145047094	0.254	0.1956	0.1
c.66_71del	p.G23_E24del	rs267606567	NO	NO	NO
c.145G>A	p.V49M	rs1063385	0.0154	0.02395	NO
c.241C>T	p.R81*	rs267606541	NO	NO	NO
c.308A>G	p.K103R	rs267606548	NO	NO	NO
c.490C>T	p.Q164*	rs104895073	NO	NO	NO
c.649C>T	p.Q217*	rs267606566	NO	NO	NO
c.713G>A	p.C238Y	rs267606569	NO	8.42e-04	NO
c.721A>G	p.K241E	rs267606573	NO	4.212e-03	NO
c.742_744del	p.Y248del	rs267606574	NO	NO	NO
c.760T>C	p.C254R	NA	NO	NO	NO
c.769A>G	p.I257V	rs267606575	NO	NO	NO
c.811C>T	p.R271W	rs267606579	NO	NO	NO
c.871G>A	p.V291M	NA	NO	NO	NO
c.896C>T	p.A299V	rs148986773	0.1002	0.04275	NA
c.910C>T	p.R304*	rs104894195	NO	1.715e-03	NO
c.911G>A	p.R304Q	rs104894190	0.0693	0.1458	NO

The allelic frequencies identified in controls in three public online databases (EVS, ExAC, and 1000 Genomes Project) are shown. MAF frequencies are expressed in percentage. MAF, minor allele frequency; NO, not observed; NA, not applicable.

signaling even in basal conditions (Formosa *et al.* 2013). Another mechanism suggested for AIP–cAMP interactions via the inhibitory G protein, G α -i2, as this inhibitory protein had lower level in AIP-deficient cells and human samples, suggesting that failure to inhibit cAMP synthesis through dysfunctional G α -i signaling underlies the development of GH-secreting pituitary adenomas in AIP mutation carriers.

In this study, we show that PDE4A4 and PDE4A8 proteins are expressed in human pituitary cells and that their expression is increased in all studied adenoma subtypes. Although prior studies had demonstrated that mRNA transcripts from the *PDE4A*, *PDE4B*, and *PDE4D* genes were present in pituitary cells and adenomas (Persani *et al.* 2001), these studies did not use immunohistochemistry or immunofluorescence to determine the precise cellular distribution of the isoforms. Interestingly, although PDE4A4 and PDE4A8 are expressed in normal pituitary, they are expressed at higher levels in four different adenoma subtypes. Although the mechanistic effect(s) of this overexpression in adenomas will require further study, this level of PDE4 expression is highly likely to downregulate cAMP signaling pathways and therefore be functionally important.

Whereas differences in normal pituitary tissues obtained through consecutive cuts are expected due to the heterogeneous admixture of several different cell types, adenomas tend to be more uniform as they represent an expansion of a single neoplastic cell representing usually at least 90% of the adenoma

cells. Therefore, we have compared the PDE isoform expression of the different pituitary adenoma subtypes. Whereas PDE4A4 was expressed lower in tumor PRL cells and higher in tumor ACTH cells, the opposite was observed for PDE4A8 isoform. Although these observed results are quite of unknown origin, the differences between isoforms might be related to the evolutionary change from one isoform to the other (Mackenzie *et al.* 2008). We note that as we had to use a different secondary antibody for the prolactinomas for the PDE4A8 staining, this might have influenced the comparisons.

AIP mutations that predispose to adenomas also impair AIP's ability to interact with PDE4A5 (Leontiou *et al.* 2008, Igreja *et al.* 2010). However, AIP interacts with a number of proteins, including survivin and RET (Vargiolu *et al.* 2009, Kang *et al.* 2011), both important growth regulatory proteins, with the aryl hydrocarbon receptor (Carver & Bradfield 1997) and with cAMP signaling pathway members G α -2 and G α -3 (Tuominen *et al.* 2015) or PRKAR1A (Schemthaler-Reiter *et al.* 2014), as well as various chaperones, such as Hsp90 and Hsp70. AIP has also been described as interacting with a different PDE, specifically PDE2A; however, the biochemical and physiologic implications of this observation remain uncertain (de Oliveira *et al.* 2007, de Oliveira & Smolenski 2009). Therefore, we need to explore further the potential role of the PDE4A4/5–AIP interaction in the pathogenesis of pituitary tumors. It is possible that PDE4A4/5 in particular, in view of its

selective interaction with AIP, plays an important role in AIP's tumor suppressor effect; however, it is also possible that increased expression of PDE4 isoforms could be a cellular response to the pro-proliferative effects of AIP loss in pituitary adenoma cells. Finally, it is possible that PDE4A4/5 and other PDE4 isoforms play a role in pituitary processes other than adenoma formation.

Given that oncogenic mutations in *AIP* attenuate its interaction with PDE4A5, it is possible that PDE4A protein isoforms have important functional roles in pituitary and pituitary adenomas. We have shown previously that AIP inhibits the enzymatic activity of PDE4A5 and therefore acts to increase cAMP levels and activate PKA. Therefore, loss of AIP function should increase the activity of PDE4A4/5, lower cAMP levels, and downregulate PKA. Given that activation, rather than inactivation, of PKA predisposes to somatotroph adenomas ('Introduction' for details), it is most likely that the effect of the AIP mutants on PDE4A4/5 is to generate a compensatory response to tumorigenesis, rather than to promote tumorigenesis. AIP may support the function of inhibitory G-protein $G_{\alpha i2}$ (Tuominen *et al.* 2015), and the lack of AIP leads to reduced $G_{\alpha i2}$ function, increased adenylyl cyclase activity, and therefore higher cAMP levels. Overactivation of adenylyl cyclase due to *gsp* mutation, however, is known to produce overexpression of PDE4 as a possible compensatory process (Peverelli *et al.* 2014). Interaction of AIP and PDE4A4/5 may play a role in this process. However, further functional experiments will be needed to assess this possibility. Interestingly, AIP mutations do not associate with *gsp* mutations in human adenomas (Hernandez-Ramirez *et al.* 2015a).

In this study, we assay a number of newly identified AIP variants and show that almost all of them attenuate their interaction with PDE4A5. This is consistent with these variants having an important effect on the biochemical activity of PDE4A5. However, potential anomalies remain, in that two variants deemed pathogenic based on clinical data, K103R and Δ G23/E24, have no clear inhibitory effect, or may augment the interaction, as measured by our assay. K103R is a conservative substitution, and both K103R and Δ G23/E24 are located outside the TPRs, which are considered to mediate AIP protein's interaction with PDE4A5. It is possible that these mutations might destabilize the AIP protein generally in mammalian cells, as we have shown for several disease-causing missense variants (Hernandez-Ramirez *et al.* 2015b) or have other effects on AIP and/or PDE4A4/5, which might not be detected by our assay. Further

functional studies might provide additional insights into the apparent aberrant effects of these mutants.

Our study has several limitations. Although there is high homology between rat PDE4A5 and human PDE4A4, the human PDE4A4 protein has not been previously shown to interact with AIP. The number of human samples assessed for these protein expressions needs to be increased in the future.

In summary, our data suggest, to our knowledge for the first time, that PDE4A4 and PDE4A8 are expressed in normal human pituitary cells and are overexpressed in all studied pituitary adenoma subtypes. Differences among different adenoma subtypes for PDE4A4 and PDE4A8 isoforms might be related to the rapid evolutionary change from one isoform to the other. We have also tested new AIP mutants for their ability to disrupt the PDE4A5–AIP interaction. Our results suggest a number of further studies. We have yet to evaluate the AIP content, and its correlation with PDE4 isoform expression, in normal and adenomatous pituitary. Determining PDE4 expression in AIP-mutated tumors will possibly also shed light on this field. The physiological function(s) and possible role of PDE4s in counteracting pituitary tumorigenesis require further investigation.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Funding

This work was supported by the NIH RO1-GMS8553 to GBB, the Bolger Prostate Cancer Research Fund (no grant number) to GBB, and the National Cancer Institute of the NIH to the University of Alabama at Birmingham Comprehensive Cancer Center under award number P30 CA013148 (for generation of monoclonal antibodies and DNA sequencing).

Author contribution statement

G B B and M K developed the idea of the study. G B B provided overall supervision and planned and performed the two-hybrid experiments. A R O Jr also provided overall supervision and planned the immunofluorescence studies. M F B and S V B P performed all immunofluorescence studies. G T performed the human variant analysis and, with M K, provided samples. M A A and L S generated and characterized the monoclonal antibodies and performed immunoblotting. G B B, M K, and A R O Jr prepared the manuscript.

Acknowledgments

The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Institutes of Health.

M K is a member of the Pfizer advisory board and has grant support from Pfizer. A R O Jr was supported by Fapemig and CNPq. The other authors declare no relevant conflicts of interest.

References

- Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, Handsaker RE, Kang HM, Marth GT & McVean GA 2012 An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* **491** 56–65. (doi:10.1038/nature11632)
- Beckers A, Aaltomäki LA, Daly AF & Karhu A 2013 Familial isolated pituitary adenomas (FIPA) and the pituitary adenoma predisposition due to mutations in the aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) gene. *Endocrine Reviews* **34** 239–277. (doi:10.1210/er.2012-1013)
- Beuschlein F, Fassnacht M, Assie G, Calebiro D, Stratakis CA, Oswald A, Ronsch CL, Wieland T, Sbera S, Faucz FR, et al. 2014 Constitutive activation of PKA catalytic subunit in adrenal Cushing's syndrome. *New England Journal of Medicine* **370** 1019–1028. (doi:10.1056/NEJMoa1310359)
- Bolger G, Michael T, Martins T, St John T, Steiner B, Rodgers L, Riggs M, Wigler M & 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** 6558–6571. (doi:10.1128/MCB.13.10.6558)
- Bolger GB 1998 Molecular genetic approaches. I. Two-hybrid systems. *Methods in Molecular Biology* **88** 101–131.
- Bolger GB 2007 Phosphodiesterase isoforms – an annotated list. In *Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases in Health and Disease*, pp 19–31. Eds JA Beavo, SH Francis & MD Houslay. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- Bolger GB, Conti M & Houslay MD 2007 Cellular functions of PDE4 enzymes. In *Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases in Health and Disease*, pp. 99–129. Eds JA Beavo, SH Francis & MD Houslay. Boca Raton, FL, USA: Taylor & Francis.
- Bolger GB, McCabill A, Huston E, Cheung YE, McSorley T, Baillie GS & Houslay MD 2003a The unique amino-terminal region of the PDE4D5 cAMP phosphodiesterase isoform confers preferential interaction with beta-arrestins. *Journal of Biological Chemistry* **278** 49230–49238. (doi:10.1074/jbc.M303772200)
- Bolger GB, McPhee I & Houslay MD 1996 Alternative splicing of cAMP-specific phosphodiesterase mRNA transcripts. Characterization of a novel tissue-specific isoform, hNPDEA8. *Journal of Biological Chemistry* **271** 1065–1071. (doi:10.1074/jbc.271.2.1065)
- Bolger GB, Peden AH, Steele MR, MacKenzie C, McLwan DG, Wallace DA, Huston E, Baillie GS & Houslay MD 2003b Attenuation of the activity of the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4A5 by interaction with the immunophilin XAP2. *Journal of Biological Chemistry* **278** 33351–33363. (doi:10.1074/jbc.M303269200)
- Bolger GB, Rodgers L & Riggs M 1994 Differential CNS expression of alternative mRNA isoforms of the mammalian genes encoding cAMP-specific phosphodiesterases. *Gene* **149** 237–244. (doi:10.1016/0378-1119(94)90155-4)
- Cavert LA & Bradfield CA 1997 Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog in vivo. *Journal of Biological Chemistry* **272** 11452–11456. (doi:10.1074/jbc.272.17.11452)
- Christian E, Anthony DE, Vadrevu S, Riddell T, Day JP, McLeod R, Adams DR, Baillie GS & Houslay MD 2010 p62 (SQSTM1) and cyclic AMP phosphodiesterase-4A4 (PDE4A4) locate to a novel, reversible protein aggregate with links to autophagy and proteasome degradation pathways. *Cell Signaling* **22** 1576–1596. (doi:10.1016/j.cellsig.2010.06.003)
- 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. (doi:10.1146/annurev-biochem.76.060305.150444)
- Daly AJ, Vanhellinghen JE, Khoo SK, Jaffrain-Rea ML, Naves LA, Guitelman MA, Murat A, Emy F, Gimenez-Roqueplo AP, Tamburano G, et al. 2007 Aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene mutations in familial isolated pituitary adenomas: analysis in 73 families. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **92** 1891–1896. (doi:10.1210/jc.2006-2513)
- de Oliveira SK, Hoffmeister M, Gambaryan S, Muller-Esterl W, Guimaraes JA & Smolenski AP 2007 Phosphodiesterase 2A forms a complex with the co-chaperone XAP2 and regulates nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor. *Journal of Biological Chemistry* **282** 13656–13663. (doi:10.1074/jbc.M610942000)
- de Oliveira SK & Smolenski A 2009 Phosphodiesterases link the aryl hydrocarbon receptor complex to cyclic nucleotide signaling. *Biochemical Pharmacology* **77** 723–733. (doi:10.1016/j.bcp.2008.08.027)
- Furlino A, Vetro A, Garavelli L, Ciccone R, London E, Stratakis CA & Zuffanti O 2014 PRKACB and Carney complex. *New England Journal of Medicine* **370** 1065–1067. (doi:10.1056/NEJMc1309730)
- Formosa E & Vassallo J 2014 cAMP signalling in the normal and tumorigenic pituitary gland. *Molecular and Cellular Endocrinology* **392** 37–50. (doi:10.1016/j.mce.2014.05.004)
- Formosa R, Xueeb-Anastasi A & Vassallo J 2013 Aip regulates cAMP signalling and GH secretion in GH3 cells. *Endocrine-Related Cancer* **20** 495–505. (doi:10.1530/ERC-13-0043)
- Francis SH, Bourn MA & Corbin JD 2011 Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions. *Physiological Reviews* **91** 651–690. (doi:10.1152/physrev.00030.2010)
- Gadella ML, Trivellin G, Hernandez Ramirez LC & Korbonits M 2013 Genetics of pituitary adenomas. *Frontiers of Hormone Research* **41** 111–140. (doi:10.1159/000345673)
- Guarente L 1983 Yeast promoters and LacZ fusions designed to study expression of cloned genes in yeast. *Methods in Enzymology* **101** 181–191. (doi:10.1016/0076-6879(83)01013-7)
- Heliovaara E, Raitila A, Launonen V, Partau A, Arola J, Lehtonen H, Sane T, Weil RJ, Viemäa O, Salmela E, et al. 2009 The expression of AIP-related molecules in elucidation of cellular pathways in pituitary adenomas. *American Journal of Pathology* **175** 2501–2507. (doi:10.2333/ajpath.2009.081131)
- Hernandez-Ramirez LC, Gabrovská P, Deneš J, Stals K, Trivellin G, Tilley D, Ferras E, Evarnson J, Ellard S, Grossman AB, et al. 2015a Landscape of familial isolated and young-onset pituitary adenomas: prospective diagnosis in AIP mutation carriers. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **100** E1242–E1254. (doi:10.1210/jc.2015-1869)
- Hernandez-Ramirez LC, Martucci E, Morgan RM, Ferras E, Trivellin G, Begum F, Tilley D, Ramos-Guajardo N, Iacovazzo D, Pindrimos C, et al. 2015b The enhanced proteasomal degradation of AIP mutant proteins is a mechanism for AIP deficiency in AIP mutation-associated pituitary adenomas. *Endocrine Reviews* **OR35-33**.
- Horvath A, Berthelet J, Groussin L, Guillaud-Bataille M, Tsang K, Cazabat L, Libe R, Remmers E, Rene-Cosail F, Faucz FR, et al. 2010 Mutations and polymorphisms in the gene encoding regulatory subunit type 1-alpha of protein kinase A (PRKAR1A): an update. *Human Mutation* **31** 369–379. (doi:10.1002/humu.21178)
- Houslay MD 2010 Underpinning compartmentalised cAMP signalling through targeted cAMP breakdown. *Trends in Biochemical Sciences* **35** 91–100. (doi:10.1016/j.tibs.2009.09.007)
- Iacovazzo D, Jose D, Bunce B, Caswell R, Hernandez-Ramirez LC, Caimari E, Ferras E, Kapur S, Gabrovská P, Dang MN, et al. 2015 X-linked acrogigantism (X-LAG): results from a large cohort of patients with pituitary gigantism. Abstract presented at the ENEA Acromegaly Workshop, Marseille, France.
- Igreja S, Chahal HS, King P, Bolger GB, Sriangalingam U, Guasti L, Chapple JI, Trivellin G, Gueorguiev M, Guegan K, et al. 2010

- Characterization of aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) mutations in familial isolated pituitary adenoma families. *Human Mutation* **31**: 950–960. (doi:10.1002/humu.21292)
- Kang BH, Xia F, Pop R, Dohi T, Socolovsky M & Altieri DC 2011 Developmental control of apoptosis by the immunophilin aryl hydrocarbon receptor-interacting protein (AIP) involves mitochondrial import of the survivin protein. *Journal of Biological Chemistry* **286**: 16758–16767. (doi:10.1074/jbc.M110.210120)
- Kinoshita N, Ohkura H & Yanagida M 1990 Distinct, essential roles of type I and 2A protein phosphatases in the control of the fission yeast cell division cycle. *Cell* **63**: 405–415.
- Keis TE 1986 Microinjected antibodies against the cytoplasmic domain of vesicular stomatitis virus glycoprotein block its transport to the cell surface. *EMBO Journal* **5**: 931–941.
- Lands CA, Masters SB, Spada A, Pace AM, Bourne HR & Vallar L 1989 GTPase inhibiting mutations activate the alpha chain of Gs and stimulate adenylyl cyclase in human pituitary tumours. *Nature* **340**: 692–696. (doi:10.1038/340692a0)
- Leontiou CA, Gueorguiev M, Van der Sluis Quinton R, Lolli F, Hassan S, Chahal HS, Iqbal SC, Jordan S, Rowe J, et al. 2008 The role of the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene in familial and sporadic pituitary adenomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **93**: 2390–2401. (doi:10.1210/jc.2007-2611)
- Mackenzie KE, Topping IC, Buga-Gaweda B, Deng C, Cheung YB, Olsen AE, Stockard CR, High ML, Baillie GS, Grizzle WL, et al. 2008 Human PDE4A8, a novel brain-expressed PDE4 cAMP-specific phosphodiesterase that has undergone rapid evolutionary change. *Biochemical Journal* **411**: 361–369. (doi:10.1042/BJ20071251)
- Maurice DH, Ke H, Ahmad F, Wang Y, Chung J & Manganiello VC 2014 Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Nature Reviews Drug Discovery* **13**: 290–314. (doi:10.1038/nrd4228)
- McPhee I, Yarwood SJ, Scotland G, Huston L, Beard MB, Ross AH, Houslay ES & Houslay MD 1999 Association with the SRC family tyrosyl kinase LYN triggers a conformational change in the catalytic region of human cAMP-specific phosphodiesterase HSPDE4A4B. Consequences for rolipram inhibition. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 11796–11810. (doi:10.1074/jbc.274.17.11796)
- Morgan RM, Hernandez-Ramirez LC, Trivellin G, Zhou L, Roe SM, Korbonits M & Prodromou C 2012 Structure of the TPR domain of AIP: lack of client protein interaction with the C-terminal alpha-7 helix of the TPR domain of AIP is sufficient for pituitary adenoma predisposition. *PLoS ONE* **7**: e33339. (doi:10.1371/journal.pone.0053339)
- Perry SJ, Baillie GS, Kohout TA, McPhee I, Magiera MM, Ang KL, Miller WE, McLean AJ, Conti M, Houslay MD, et al. 2002 Targeting of cyclic AMP degradation to beta 2-adrenergic receptors by beta-arrestins. *Science* **298**: 834–836. (doi:10.1126/science.1074683)
- Persani L, Bongato S, Lania A, Filopanti M, Mantovani G, Conti M & Spada A 2001 Relevant cAMP-specific phosphodiesterase isoforms in human pituitary: effect of G(alpha) mutations. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **86**: 3795–3800. (doi:10.1210/jcem.86.8.7779)
- Peverelli E, Mantovani G, Lania AG & Spada A 2014 cAMP in the pituitary: an old messenger for multiple signals. *Journal of Molecular Endocrinology* **52**: R67–R77. (doi:10.1530/JME-13-0172)
- Ribeiro-Oliveira A Jr, Franchi G, Kola B, Dalino F, Pinheiro SV, Salahuddin N, Musat M, Goth MI, Czihak S, Hanzely Z, et al. 2008 Protein western array analysis in human pituitary tumours: insights and limitations. *Endocrine-Related Cancer* **15**: 1099–1114. (doi:10.1677/ERC-08-0003)
- Salpea P & Stratakis CA 2014 Carney complex and McCune Albright syndrome: an overview of clinical manifestations and human molecular genetics. *Molecular and Cellular Endocrinology* **386**: 85–91. (doi:10.1016/j.mce.2013.08.022)
- Schemthamer-Reiter MH, Trivellin G, Nesterova M, Hernandez-Ramirez LC, Alfonsi ED, deLacruz SM, Stratakis CA & Korbonits M 2014 Interaction of AIP with the cAMP-dependent protein kinase (PKA) pathway and its role in pituitary tumor formation. *Endocrine Reviews* **35**: P99–4.
- Sikorki BS, Bogucki MS, Goebel M & Hieter P 1990 A repeating amino acid motif in CDC23 defines a family of proteins and a new relationship among genes required for mitosis and RNA synthesis. *Cell* **60**: 307–317. (doi:10.1016/0092-8674(90)90745-2)
- Steele MR, McCahill A, Thompson DS, Mackenzie C, Isaacs NW, Houslay MD & Bolger GB 2001 Identification of a surface on the beta-propeller protein RACK1 that interacts with the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D5. *Cell Signaling* **13**: 507–513. (doi:10.1016/S0898-6568(01)00167-X)
- Stratakis CA 2013 cAMP/PKA signaling defects in tumor: genetics and tissue-specific pluripotential cell-derived lesions in human and mouse. *Molecular and Cellular Endocrinology* **371**: 208–220. (doi:10.1016/j.mce.2013.01.015)
- Trivellin G, Daly AJ, Faucz FR, Yuan B, Rostomyan L, Larco DO, Schemthamer-Reiter MH, Szarek E, Leal JE, Caberg JH, et al. 2014 Gigantism and acromegaly due to Xq26 microduplications and G78101 mutation. *New England Journal of Medicine* **371**: 2363–2374. (doi:10.1056/NEJMoa1408028)
- Tuominen L, Heliovaara E, Raitila A, Rautiainen MR, Mehine M, Kartainen R, Donner I, Aittomaki V, Lehtonen HJ, Ahlsten M, et al. 2015 AIP inactivation leads to pituitary tumorigenesis through defective Galphai-cAMP signaling. *Oncogene* **34**: 1174–1184. (doi:10.1038/onc.2014.50)
- Vargiolu M, Fusco D, Kuzelac I, Dierberger D, Baumeister R, Morra I, Melcarne A, Rimondini R, Bonneo G & Bonora E 2009 The tyrosine kinase receptor RET interacts in vivo with aryl hydrocarbon receptor-interacting protein to alter survivin availability. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **94**: 2571–2578. (doi:10.1210/jc.2008-1980)
- Vierman O, Georgitzi M, Lehtonen B, Vahteristo P, Kokko A, Raitila A, Tuppurainen K, Ebeling TM, Salmela PI, Paschke R, et al. 2006 Pituitary adenoma predisposition caused by germline mutations in the AIP gene. *Science* **312**: 1228–1230. (doi:10.1126/science.1126100)
- Weiner MP, Costa GL, Schoettlin W, Cline J, Mathur E & Basler JC 1994 Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene* **151**: 119–123. (doi:10.1016/0378-1119(94)90641-6)
- Willoughby D & Cooper DM 2007 Organization and Ca²⁺ regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains. *Physiological Reviews* **87**: 965–1010. (doi:10.1152/physrev.00049.2006)
- Yarwood SJ, Steele MR, Scotland G, Houslay MD & Bolger GB 1999 The RACK1 signalling scaffold protein selectively interacts with the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D5 isoform. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 14909–14917. (doi:10.1074/jbc.274.21.14909)

Received in final form 31 March 2016

Accepted 18 April 2016



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Molecular and Cellular Endocrinology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mce

Reduced protein expression of the phosphodiesterases PDE4A4 and PDE4A8 in *AIP* mutation positive somatotroph adenomas

Mariana Ferreira Bizzi^a, Sergio Veloso Brant Pinheiro^b, Graeme B. Bolger^{c,d},
Junia Ribeiro de Oliveira Longo Schweizer^a, Alexandre V. Giannetti^c, Mary N. Dang^f,
Antonio Ribeiro-Oliveira Jr.^{a,g,*}, Márta Korbonits^{f,g,1}

^a Department of Internal Medicine, The Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte/Minas Gerais, 30130-100, Brazil

^b Department of Pediatrics, The Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte/Minas Gerais, 30130-100, Brazil

^c Department of Medicine, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL 35294, USA

^d Department of Pharmacology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL 35294, USA

^e Department of Surgery, The Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte/Minas Gerais, 30130-100, Brazil

^f Centre for Endocrinology of Queen Mary, University of London, London EC1M 6BQ, UK

ARTICLE INFO

Keywords:
GH-Secreting tumour
Acromegaly
AIP
Phosphodiesterase
Pituitary

ABSTRACT

Type 4 phosphodiesterases (PDE4s) of the large PDE enzyme superfamily have unique specificity for cAMP and may, therefore, be relevant for somatotroph tumorigenesis. Somatotroph adenomas typically overexpress PDEs probably as part of a compensatory mechanism to reduce cAMP levels. The rat PDE4A5 isoform (human homolog PDE4A4) interacts with the *AIP* protein, coded by a tumour suppressor gene mutated in a subgroup of familial isolated pituitary adenomas (FIPAs). PDE4A8 is the closest related isoform of PDE4A4. We aimed to evaluate the expression of both PDE4A4 and PDE4A8 in GH cells of *AIP*-mutated adenomas and compare their expression with that in GH cells from sporadic *AIP*-mutation negative GH-secreting adenomas, where we had shown previously that both PDE4A4 and PDE4A8 isoforms had been over-expressed. Confocal immunofluorescence analysis showed that both PDE4A8 and PDE4A4 had lower expression in *AIP*-mutated somatotrophinoma samples compared to sporadic GH-secreting tumours ($P < 0.0001$ for both). Based on the association of low PDE4A4 and PDE4A8 expression with germline *AIP*-mutations positive samples we suggest that lack of *AIP* hinders the upregulation of PDE4A8 and PDE4A4 protein seen in sporadic somatotrophinomas. These data point to a unique disturbance of the cAMP-PDE pathway in *AIP*-mutation positive adenomas, which may help to explain their well-described poor response to somatostatin analogues.

1. Introduction

Cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) comprise a large enzyme superfamily (PDE1 through PDE11) that breaks down the second messengers cAMP and/or cGMP and thereby regulate signal transduction pathways (Francis et al., 2011). PDE4 enzymes are differentiated from other members of the PDE superfamily by their specificity for cAMP. PDE4 subtypes PDE4A, PDE4B, PDE4C and PDE4D are encoded by four different genes and each of these genes encodes multiple isoforms, via isoform-specific promoters or by alternative splicing (Conti et al., 2003; Houslay and Adams, 2003; Houslay et al., 1998). The PDE4A4 (rat analogue: PDE4A5) isoform is expressed in a variety of

tissues, including various brain regions (Bolger et al., 1993, 1994, 1996; McPhee et al., 2001). This isoform has a highly conserved amino-terminal region with 88% similarity with the rat PDE4A5 amino-terminal region (Bolger et al., 1994) and two upstream conserved regions (UCR1 and UCR2) which is also present in PDE4A8 (Mackenzie et al., 2008). The PDE4A8 isoform, expressed in the brain and skeletal muscle, is closely related to PDE4A4, differing only in its amino-terminal region (Mackenzie et al., 2008) and containing the EELD motif in the UCR2, which may be relevant to protein-protein interactions.

When compared to other PDE isoforms, human PDE4A4/A5 is uniquely associated with the *AIP* protein (aryl hydrocarbon receptor interacting protein) (Bolger et al., 2003), a co-chaperone known to have

* Corresponding author. Centre for Endocrinology, William Harvey Research Institute, Barts and The London School of Medicine, Queen Mary University of London, Charterhouse Square, London EC1M 6BQ, UK.

** Corresponding author. Department of Internal Medicine, The Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte/Minas Gerais, 30130-100, Brazil.

E-mail addresses: antoniorojr@gmail.com (A. Ribeiro-Oliveira), m.korbonits@qmul.ac.uk (M. Korbonits).

¹ ARO Jr and MK contributed equally to the manuscript.

<https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.04.014>

Received 14 December 2017; Received in revised form 29 March 2018; Accepted 29 April 2018

0303-7207 / Crown Copyright © 2018 Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Please cite this article as: Bizzi, M.F., Molecular and Cellular Endocrinology (2018), <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.04.014>

tumour suppressor functions in the pituitary. Loss of function mutations in AIP are typically associated with invasive, difficult to treat somatotroph adenomas occurring in children or young adults (Beckers et al., 2013) either in familial or simplex setting. While wild-type AIP protein interacts in vitro with PDE4A5 (Bolger et al., 2003), mutated AIP protein loses its ability to interact with PDE4A5 (Bolger et al., 2016; Igreja et al., 2010). It is not known how would AIP interact with the PDE4 molecules, but as a co-chaperone it might influence protein levels in the cell.

We have recently demonstrated the expression of both PDE4A8 and PDE4A4 in normal human pituitary tissue, and established that both of these proteins are overexpressed in GH-, ACTH-, PRL- and FSH-positive adenomas (Bolger et al., 2016). Here we studied PDE4A4 and PDE4A8 protein expression in GH-secreting tumours from patients carrying germline AIP mutations. We hypothesized that lack of functional AIP protein might alter the expression of these phosphodiesterase isoforms.

2. Materials and methods

2.1. Subjects and patients

Samples from pituitary adenomas (n = 11) were obtained at transphenoidal surgery (Table 1). Patients were diagnosed on the basis of clinical and biochemical findings of acromegaly before surgery, followed by immunohistochemical determination confirming the GH expression: all slides utilized from GH-secreting tumours showed more than 90% tumour tissue, as confirmed by the haematoxylin and eosin technique. Autopsy pituitary samples (n = 3) were collected within 24-h of death from adult patients without evidence of any endocrine abnormality and were taken as controls. Pituitary architecture was evaluated by haematoxylin and eosin and reticulin staining. Slides from both normal pituitary tissue and GH-secreting tumours were obtained through consecutive cuts; in some samples we had limited tissue available. Written informed consent was obtained from all pituitary patients, and the protocol was approved by the institutional Research Ethics Committee.

All patients with acromegaly (Table 1) included in the study showed clinical and biochemical signs of acromegaly and tumour samples were positive for GH immunohistochemistry. Patients (2 males and 2 females) with AIP mutations (F269_H275dup, R304*, Q164*, and E222*) had macroadenomas with a median age of diagnosis at 25.5 years (range 23–32). Sporadic patients (4 males and 3 females) with somatotroph macroadenomas had a median age of diagnosis of 47.5 years (range 35–70). As expected, patients harbouring AIP mutations were

characterized by early onset of disease (age of diagnosis, $P < 0.01$ when compared with sporadic cases). None of the patients with acromegaly were treated before the surgery with somatostatin analogues or dopamine agonists.

2.2. Immunoblotting, immunofluorescent staining, and confocal microscopy

To generate specific antibodies against human PDE4A4 and PDE4A8, COS7 cells were transfected with the plasmids containing pcDNAN46VSV (including a fragment of a vesicular stomatitis virus (VSV) epitope at their carboxy terminus) to express human PDE4A4, or with pcDNA4A8VSV to express human PDE4A8, or with vector pcDNA3 (Life Technologies), as previously described (McPhee et al., 1999; Mackenzie et al., 2008; Christian et al., 2010). Incubation with the primary PDE4A4 and PDE4A8 (dilution 1:500) and with VSV (Sigma, USA, Kreis, 1986) antibodies were performed for 1 h in Tris-buffered saline with 0.1% Tween-20, followed by 2 washes in the same buffer. Secondary antibody incubations (SC-5099, Santa Cruz Biotechnology, USA, 1:10,000) were performed in the same buffer, followed by 2 washes in the same buffer. Signal development was performed using enhanced chemiluminescence (Pierce-ThermoFisher, Waltham, MA USA).

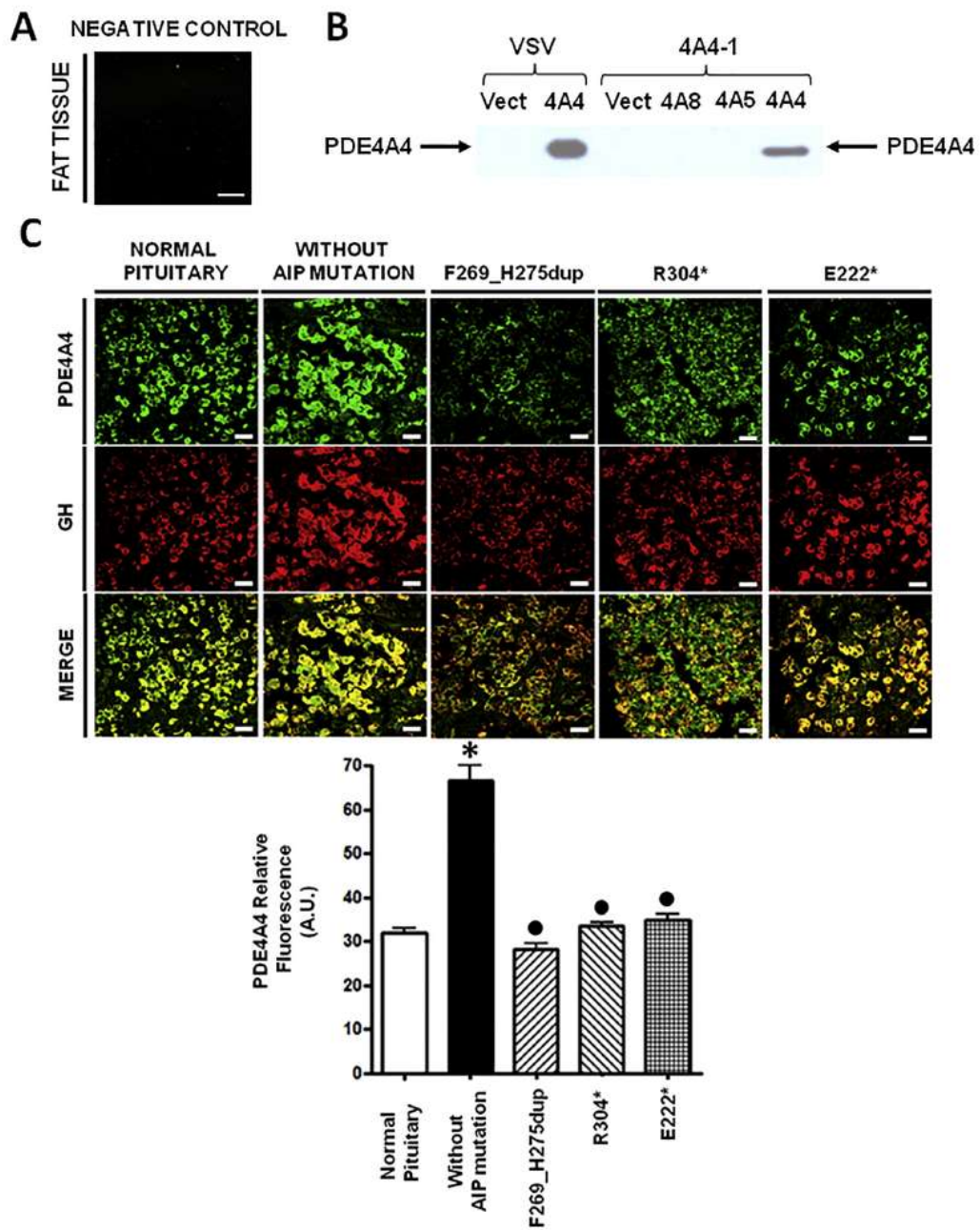
For human PDE4A4 staining we used the mouse monoclonal antibody 4A4-1 generated against the specific amino-terminal region of PDE4A4 (SAERAERERQPHRPIERADA) (GenBank L20965) (Bolger et al., 1993, 1994, 2016; Mackenzie et al., 2008). For human PDE4A8 staining we used a mouse monoclonal antibody 4E1.16, that was generated using the unique amino-terminal region of PDE4A8 sequence GDRSRETPESTRAN (GenBank AY593872) (Bolger et al., 2016; Mackenzie et al., 2008). All monoclonal antibodies were purified by limiting dilution and then grown in culture. Antibodies were then purified from culture supernatants with a protein G-affinity matrix (Pierce-ThermoFisher), and there was no cross reactivity between the antibodies.

Immunostaining for GH, PDE4A4 and PDE4A8 was performed as previously described (Bolger et al., 2016), using fat tissue as negative control. We performed confocal immunofluorescence analysis of GH-secreting adenomas, with and without AIP mutations, and normal pituitary tissue. In brief, after deparaffinization and application of pre-warmed retrieval solution (Dako, California, USA, 40 ml of stock into 360 ml water) sections were incubated in blocking solution (1% BSA and 0.1% Tween 20) at room temperature for 1 h and then incubated overnight at 4 °C with one of the primary antibodies. In order to colocalize the selected proteins in somatotroph cells, goat anti-GH (L20; 1:50) from Santa Cruz, were also added to the incubation buffer. Secondary antibodies were applied for 1 h with anti-goat Alexa 546 (1:100, Invitrogen, USA), anti-rabbit Alexa 488 (1:400, Invitrogen) or anti-mouse DyLight 488 (Pierce-ThermoFisher), according to the primary antibody previously used. Images were captured through confocal microscope (Leica TCS SP5), 63 × objective, and 630 × original magnification).

All confocal settings were determined at the beginning of the imaging session and remained unchanged. For quantitative analysis, images were captured at eight bits and analysed in grey scale, using the protocol we have published previously (Bolger et al., 2016; Ribeiro-Oliveira et al., 2008). Three to four images were captured randomly from each sample and three measurements were obtained for each image, with about 30–50 cells also chosen randomly in each analysed sample. ImageJ (NIH, Bethesda, USA) software was used to quantify fluorescence intensity and area intensity, as well as area of each individual cell. The background fluorescence and the energy intensity threshold were then subtracted from the region of interest in the same level for all examined pictures. The relative fluorescence corresponded to the unit 'grey level', varying from zero (black) to 255 (white), as an average of the area for each cell (sum of grey value of all pixels divided by the number of pixels/area).

Table 1
Clinical characteristics of the patients included in the study.

Patient Number	Sex	Diagnosis	Size	AIP mutation	Age at diagnosis
Patient AIP_1	M	Gigantism	macro	p.F269_H275dup	24
Patient AIP_2	F	Acromegaly	macro	p.R304*	27
Patient AIP_3	M	Acromegaly	macro	p.E222*	32
Patient AIP_4	F	Acromegaly	macro	p.Q164*	23
Patient control_1	F	Acromegaly	macro	negative	53
Patient control_2	F	Acromegaly	macro	negative	42
Patient control_3	F	Acromegaly	macro	negative	40
Patient control_4	M	Acromegaly	macro	negative	NA
Patient control_5	M	Acromegaly	macro	negative	70
Patient control_6	M	Acromegaly	macro	negative	53
Patient control_7	M	Acromegaly	macro	negative	39



(caption on next page)

Fig. 1. Expression of PDE4A4 in GH-secreting tumours with different *AIP* mutations.

(A) Immunofluorescence with the 4A4-1 antibody in fat tissue, as a negative control. (B) Immunoblotting with the 4A4-1 antibody. COS7 cells were transfected to express human PDE4A4 (4A4) or vector (Vect). All PDE constructs also encoded a VSV epitope at the carboxyl-terminus of the protein. LDS-PAGE and immunoblotting with an antibody against VSV, or with 4A4-1, were performed as described in the 'Materials and methods' section. The PDE4A4 protein migrated at 97 kDa. (C) Double immunofluorescent staining using monoclonal 4A4-1 (green staining) and polyclonal GH antibody (red staining) in normal pituitary (representative example from the 3 samples), in GH-secreting tumour without *AIP* mutation (representative example from the 7 samples), and in GH-secreting tumour samples with *AIP* mutations [(F269_H275dup, R304*, E222*)]. The bar graphs below the images provide semi-quantitation of the relative fluorescence of PDE4A4 in the 3 normal pituitaries, 7 sporadic adenomas and the 3 individual *AIP* mutation positive samples. Scale bar: 25 μ m. All data are shown as mean \pm standard error; AU, arbitrary units; * $P < 0.0001$ in relation to normal GH pituitary cells, and $\bullet P < 0.0001$ in relation to non-mutated GH-secreting tumour cells. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

2.3. Statistical analysis

Variables were first checked for normal distribution through the Shapiro-Wilk test. Data were tested for statistical significance with the non-parametric Mann-Whitney test or the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's multiple comparisons test using GraphPad Prism 6.0 (La Jolla, USA). Significance was taken as $P < 0.05$. Data are shown as mean \pm standard error.

3. Results

3.1. The expression of PDE4A4 in GH-secreting tumours with *AIP* mutations

We found overexpression of PDE4A4 in the sporadic GH-secreting tumour cells when compared to GH cells in normal pituitary ($P < 0.0001$, Fig. 1), confirming results that we have seen previously in a different set of samples (Bolger et al., 2016). On the other hand, GH-secreting tumour cells with *AIP* mutations showed a significant decrease in the expression of PDE4A4 when compared to those without an *AIP* mutation ($P < 0.0001$, for all), with expression levels similar to those observed in GH cells of normal pituitary.

3.2. The expression of PDE4A8 in GH-secreting tumours with *AIP* mutations

There was an increased expression of PDE4A8 in somatotroph tumour cells from patients without *AIP* mutations when compared to normal pituitary GH cells ($P < 0.0001$, Fig. 2), confirming results that we have published previously (Bolger et al., 2016). However, somatotroph adenomas from patients with *AIP* mutations showed a significant decrease in the expression of PDE4A8, when compared to tumour cells without an *AIP* mutation ($P < 0.0001$). For two of the analysed mutants, the expression level of PDE4A8 was also decreased when compared to normal pituitary.

3.3. PDE4A4 and PDE4A8 expressions in *AIP* mutation negative GH-secreting tumours

We compared the expression of PDE4A4 to the expression of PDE4A8 in *AIP* mutation negative GH-secreting tumours. We expressed the level of these two PDE isoforms in the *AIP* negative tumours based on the level seen in somatotroph cells of the normal pituitary and then compared the relative expression of PDE4A4 to that of PDE4A8 ($P < 0.0001$, Fig. 3) in *AIP* mutation negative GH-secreting tumours. We found a higher level of PDE4A4 expression than PDE4A8 (Fig. 3), and also higher PDE4A4 was seen in the *AIP* mutation positive samples than PDE4A8 (Figs. 1 and 2), suggesting that this isoform plays a key role in the compensatory rise of PDEs in somatotrophinomas.

4. Discussion

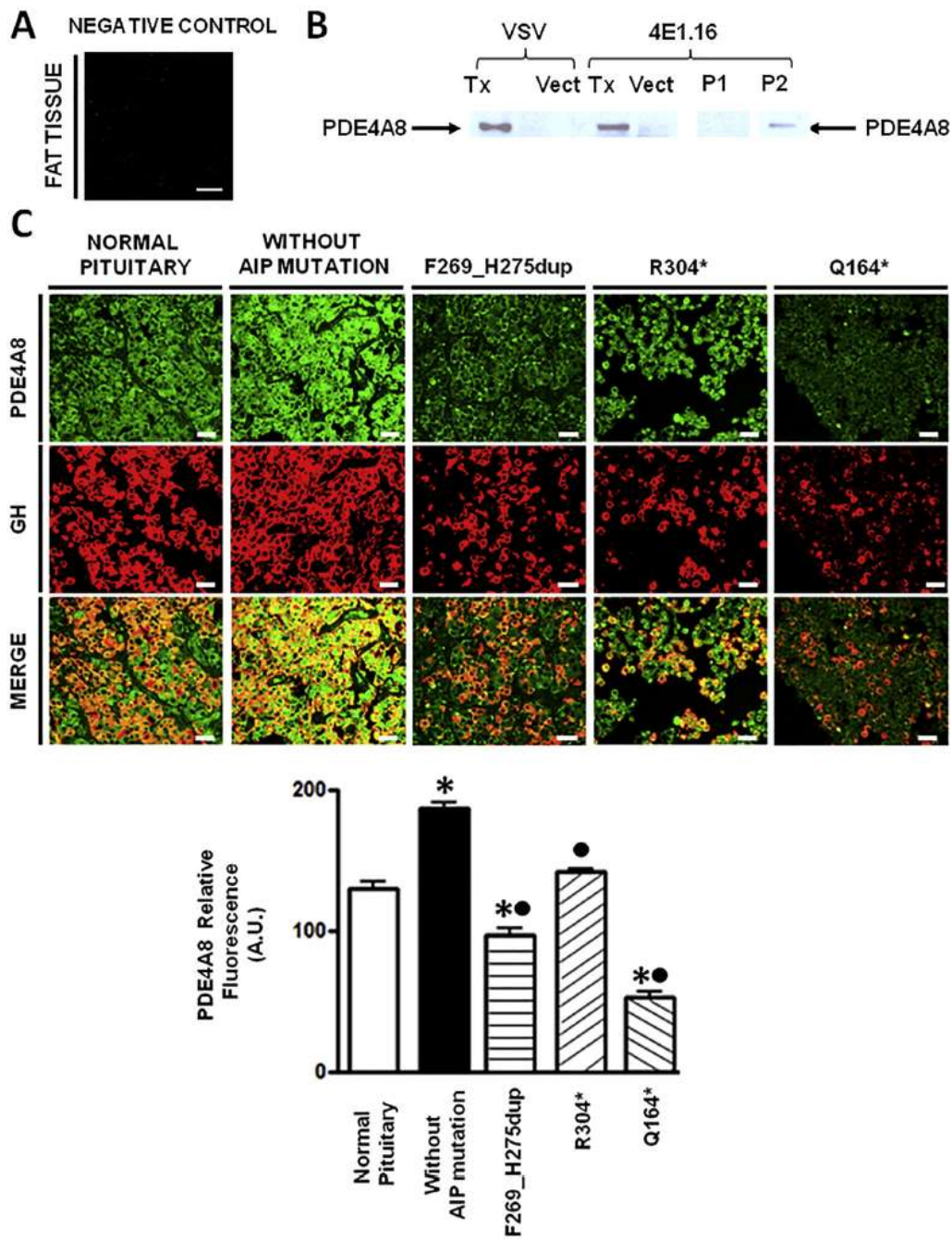
Changes affecting the cAMP pathway are known to predispose to somatotroph adenomas, as patients with somatic *GNAS* mutations leading to overactive adenylyl cyclase or with germline *PRKARIA* mutations leading to disinhibited protein kinase A often develop

pituitary hyperplasia or adenoma (Hernández-Ramírez et al., 2018). PDEs play a key role in cAMP signalling, by catalysing the breakdown of cAMP to AMP, thus influencing downstream regulatory effectors (Francis et al., 2011; Maurice et al., 2014). Expression of overall PDE4A mRNA was found to be variable in somatotroph tumours previously (Peisani et al., 2001), independently of gsp mutation status, while PDE4A subtypes were not studied at the protein level. We have recently established that PDE4A8 and PDE4A4 are both consistently over-expressed in sporadic somatotroph adenomas (Bolger et al., 2016). In this study, however, we have found that both isoforms are significantly reduced in somatotrophinomas with *AIP* mutations. This loss of PDE4A4 and PDE4A8 protein might be due to the loss of functional *AIP* protein. As a co-chaperone, *AIP* may help proteins to keep their normal protein conformation and therefore stability. Indeed, AHR, a well-known binding partner of *AIP*, have reduced levels in *AIP*-mutated pituitary adenomas (Jaffrain-Rea et al., 2009).

The samples used in this study had either a nonsense mutation or a segmental duplication. The nonsense mutations lead either to nonsense mediated decay and therefore no protein at all (Q164* and E222*) or to very rapid degradation of the shortened protein (R304*) (Hernández-Ramírez et al., 2016) which anyway lacks part of the crucial C-terminal alpha-helix, therefore not representing functional protein. We have recently shown that the segmental duplication also leads to a very rapid degradation of the protein (Salvatori et al., 2017), while the duplicated region theoretically disrupts a protein segment important for partner binding. Therefore all these mutations result in complete lack of *AIP* function.

When samples are compared for the presence of the different phosphodiesterases isoforms, we noted that PDE4A4 expression increases more than PDE4A8 in *AIP* mutation negative adenomas, suggesting that PDE4A4 compensatory increase is higher for this isoform. PDE4A4/5 is known to bind to *AIP*, and the EEDL motif is also present in PDE4A8, suggesting that theoretically this protein might also bind *AIP*. However, no experimental data are available regarding this due to the poor expression of PDE4A8 in *in vitro* experimental settings (Bolger et al., 2016). As *AIP* is a co-chaperone and one of its roles is to protect proteins from degradation, we hypothesise that lack of *AIP* may lead to accelerated PDE4A4/8 degradation in *AIP*-mutation positive tumours.

Overactivation of the cAMP pathway is known to increase PDE levels (Peverelli et al., 2014), possibly as a compensatory mechanism. Indeed, we have observed increased PDE4A4 and PDE4A8 protein expression in sporadic adenomas both in a previous (Bolger et al., 2016) and in the current study. However, in adenomas with *AIP* mutations, the decreased expression of PDE4A4 and PDE4A8 in the mutation samples suggests that these tumours have an altered balance of the cAMP-PDE pathway which may play a role in the tumorigenesis. We note that while both PDE4A4 and PDE4A8 are showing changes into the same direction, there is absolutely no cross reactivity between these antibodies (Bolger et al., 2016; Mackenzie et al., 2008). In addition, the higher expression of PDE4A4 in GH-secreting adenomas without *AIP* mutation compared to PDE4A8 possibly explains why the expression of PDE4A4 in the mutants have not reached lower levels than in normal pituitary, as observed for two mutants with PDE4A8. We see some variability of the reduced PDE4A8 expression, probably related to the



(caption on next page)

Fig. 2. Expression of PDE4A8 in GH-secreting tumours with different AIP mutations. (A) Immunofluorescence with the 4E1.16 antibody in fat tissue, as a negative control. (B) Immunoblotting with the 4E1.16 antibody. Extracts from COS7 cells transfected to express PDE4A8-VSV or with vector (Vect) were immunoblotted with an antibody against VSV or with 4E1.16. On separate gels, PDE4A8-VSV extracts were immunoblotted with 4E1.16 and the peptide used as immunogen (P1), or an unrelated peptide (P2). The PDE4A8 protein migrated at 102kDa. (C) Double immunofluorescent staining using monoclonal 4E1.16 (green staining) and polyclonal GH antibody (red staining) in normal pituitary (representative example from the 3 samples), in GH-secreting tumour without AIP mutation (representative example from the 7 samples), and in GH-secreting tumour samples with AIP mutations (F269_H275dup, R304* and Q164*). The bar graphs below the images provide semi-quantitation of the relative fluorescence of PDE4A8 in the 3 normal pituitaries, 7 sporadic adenomas and the 3 individual AIP mutation positive samples. Scale bar: 25 μ m. All data are shown as means \pm standard error; AU, arbitrary units; *P < 0.0001 for comparisons with normal GH pituitary cells, and \bullet P < 0.0001 for comparisons with non-mutated GH-secreting tumour cells. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

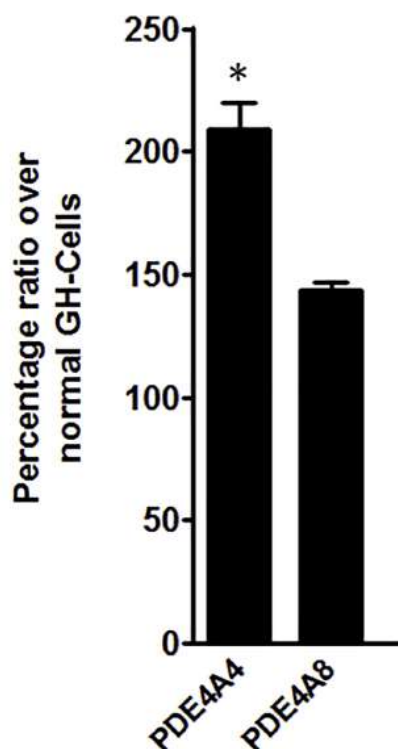


Fig. 3. Comparison of the expression ratio of PDE4A4 and PDE4A8 in GH-secreting tumours over normal GH cells. *P < 0.0001 for comparison.

small sample size.

In vitro data using AIP overexpression in GH3 cells lead to increased cAMP levels but this was not altered by general phosphodiesterase inhibitor IBMX or PDE4 inhibitor rolipram, suggesting that PDEs do not have a role in the AIP-induced reduction of cAMP levels in this experimental setup (Formosa et al., 2013). Lack or low level of AIP leads to reduced expression of inhibitory G protein $G_{\alpha\text{phat-2}}$ both in vitro and in human samples (Ritvonen et al., 2017; Tuominen et al., 2015), but it is unclear how these data relate to the enzymatic activity of phosphodiesterases.

This study carries some limitations. We have a small sample size for AIP mutation positive patients due to the rarity of the disease and scarcity of the available high-quality AIP mutant tissue blocks. We used a different sample for PDE4A4 and PDE4A8, but as both used samples

were nonsense mutations, they should be similar in terms of disease mechanism. However, even with small sample size we were able to see significant changes in pituitary PDE expression as well as to show concordance of expression whenever samples were tested for both isoforms. Furthermore, the double immunostaining we have used in this study is the gold standard method to co-localize protein expression in neoplastic and normal somatotroph tissues from patient samples. In vitro studies are needed to further investigate the suggested mechanism.

In conclusion, there is reduced expression of PDE4A4 and PDE4A8 in AIP-mutated pituitary adenomas compared to sporadic somatotrophinomas which have a, probably compensatory, elevation of these cAMP-degrading PDE isoforms. These changes could lead to upregulation of the cAMP-pathway and support tumorigenesis while possibly contributing to somatostatin receptor ligand-resistance of patients with AIP mutations. Further studies should investigate these pathways in the light of the data presented here.

Acknowledgements

We are grateful for the patients and the referring physicians for the support of the study. Grant sponsor: NIH RO1-GM58553 to GBB, The Bolger Prostate Cancer Research Fund to GBB, and the National Cancer Institute of the National Institutes of Health to the University of Alabama at Birmingham Comprehensive Cancer Center under award number P30 CA013148 (for generation of monoclonal antibodies). The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Institutes of Health. AROJr was supported by FAPEMIG and CNPq. We are grateful for the generous support from the Medical Research Council (MR/M018539/1) and Pfizer (W1206534) to MK. The authors certify that they have no relevant conflicts of interest as related to this publication.

References

- Beckers, A., Aaltonen, L.A., Daly, A.F., Karhu, A., 2013. Familial isolated pituitary adenomas (FIPA) and the pituitary adenoma predisposition due to mutations in the aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) gene. *Endocr. Rev.* 34, 239–277.
- Bolger, G.B., Michaeli, T., Martins, T., St John, T., Steiner, B., Rodgers, L., Riggs, M., Wigler, M., 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. *Mol. Cell Biol.* 13, 6558–6571.
- Bolger, G.B., Rodgers, L., Riggs, M., 1994. Differential CNS expression of alternative mRNA isoforms of the mammalian genes encoding cAMP-specific phosphodiesterases. *Gene* 149, 237–244.
- Bolger, G.B., McPhee, L., Houslay, M.D., 1996. Alternative splicing of cAMP-specific phosphodiesterase mRNA transcripts. Characterization of a novel tissue-specific isoform, RNPDE4A8. *J. Biol. Chem.* 271, 1065–1071.
- Bolger, G.B., Peden, A.H., Steele, M.R., MacKenzie, C., McEwan, D.G., Wallace, D.A., Huston, E., Baillie, G.S., Houslay, M.D., 2003. Attenuation of the activity of the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4A5 by interaction with the immunophilin XAP2. *J. Biol. Chem.* 278, 33351–33363.
- Bolger, G.B., Bizzi, M.F., Pinheiro, S.V., Trivellin, G., Smoot, L., Accavitti, M.A., Korbonits, M., Ribeiro-Oliveira, A., 2016. cAMP-specific PDE4 phosphodiesterases and AIP in the pathogenesis of pituitary tumors. *Endocr. Relat. Canc.* 23, 419–431.
- Conti, M., Richter, W., Mehats, C., Livera, G., Park, J.Y., Jin, C., 2003. Cyclic AMP-specific PDE4 phosphodiesterases as critical components of cyclic AMP signaling. *J. Biol. Chem.* 278, 5493–5496.
- Christian, F., Anthony, D.F., Vadrevu, S., Riddell, T., Day, J.P., McLeod, R., Adams, D.R.,

- Baillie, G.S., Houslay, M.D., 2010. p62 (SQSTM1) and cyclic AMP phosphodiesterase-4A4 (PDE4A4) locate to a novel, reversible protein aggregate with links to autophagy and proteasome degradation pathways. *Cell. Signal.* 22, 1576–1596.
- Fomosa, R., Xuereb-Amatai, A., Vassallo, J., 2013. AIP regulates cAMP signalling and GH secretion in GH3 cells. *Endocr. Relat. Canc.* 20, 495–505.
- Francis, S.H., Blount, M.A., Corbin, J.D., 2011. Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions. *Physiol. Rev.* 91, 651–690.
- Hernández-Ramírez, L.C., Martucci, F., Morgan, R.M., Trivellin, G., Tilley, D., Ramos-Guajardo, N., Iacovazzo, D., D'Acquisto, F., Prodromou, C., Korbonits, M., 2016. Rapid proteasomal degradation of mutant proteins is the primary mechanism leading to tumorigenesis in patients with missense AIP mutations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101, 3144–3154.
- Hernández-Ramírez, L.C., Trivellin, G., Stratakis, C.A., 2018. Cyclic 3',5'-adenosine monophosphate (cAMP) signaling in the anterior pituitary gland in health and disease. *Mol. Cell. Endocrinol.* 463, 76–82.
- Houslay, M.D., Sullivan, M., Bolger, G.B., 1998. The multienzyme PDE4 cyclic adenosine monophosphate-specific phosphodiesterase family: intracellular targeting, regulation, and selective inhibition by compounds exerting anti-inflammatory and antidepressant actions. *Adv. Pharmacol.* 44, 225–342.
- Houslay, M.D., Adams, D.R., 2003. PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochem. J.* 370, 1–18.
- Igreja, S., Chahal, H.S., King, P., Bolger, G.B., Srirangalingam, U., Guasti, L., Chapple, J.P., Trivellin, G., Gueorquiev, M., Guegan, K., Stals, K., Khoo, B., Kumar, A.V., Ellard, S., Grossman, A.B., Korbonits, M., 2010. Characterization of aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) mutations in familial isolated pituitary adenoma families. *Hum. Mutat.* 31, 950–960.
- Jaffrain-Rea, M.L., Angelini, M., Gargano, D., Tichomirowa, M.A., Daly, A.F., Vanbellighen, J.F., D'Innocenzo, E., Barlier, A., Giangaspero, F., Esposito, V., Ventura, L., Arcella, A., Theodoropoulou, M., Naves, L.A., Fajardo, C., Zacharieva, S., Rohmer, V., Brue, T., Qulino, A., Cantore, G., Alessi, E., Beckers, A., 2009. Expression of aryl hydrocarbon receptor (AHR) and AHR-interacting protein in pituitary adenomas: pathological and clinical implications. *Endocr. Relat. Canc.* 16, 1029–1043.
- Kreis, T.E., 1986. Microinjected antibodies against the cytoplasmic domain of vesicular stomatitis virus glycoprotein block its transport to the cell surface. *EMBO J.* 5, 931–941.
- Mackenzie, K.F., Topping, E.C., Bugaj-Gaweda, B., Deng, C., Cheung, Y.F., Olsen, A.E., Stockard, C.R., High Mitchell, L., Baillie, G.S., Grizzle, W.E., De Vivo, M., Houslay, M.D., Wang, D., Bolger, G.B., 2008. Human PDE4A8, a novel brain-expressed PDE4 cAMP-specific phosphodiesterase that has undergone rapid evolutionary change. *Biochem. J.* 411, 361–369.
- Maurice, D.H., Ke, H., Ahmad, F., Wang, Y., Chung, J., Manganiello, V.C., 2014. Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 13, 290–314.
- McPhee, I., Yarwood, S.J., Scotland, G., Huston, E., Beard, M.B., Ross, A.H., Houslay, E.S., Houslay, M.D., 1999. Association with the SRC family tyrosyl kinase LYN triggers a conformational change in the catalytic region of human cAMP-specific phosphodiesterase HSPDE4A4B. Consequences for rolipram inhibition. *J. Biol. Chem.* 274, 11796–11810.
- McPhee, I., Cochran, S., Houslay, M.D., 2001. The novel long PDE4A10 cyclic AMP phosphodiesterase shows a pattern of expression within brain that is distinct from the long PDE4A5 and short PDE4A1 isoforms. *Cell. Signal.* 13, 911–918.
- Persani, L., Borgato, S., Lania, A., Filopanti, M., Mantovani, G., Conti, M., Spada, A., 2001. Relevant cAMP-specific phosphodiesterase isoforms in human pituitary: effect of Gs(alpha) mutations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 3795–3800.
- Peverelli, E., Mantovani, G., Lania, A.G., Spada, A., 2014. cAMP in the pituitary: an old messenger for multiple signals. *J. Mol. Endocrinol.* 52, R67–R77.
- Ribeiro-Oliveira, A., Franchi, G., Kola, B., Dalino, P., Pinheiro, S.V., Salahuddin, N., Musat, M., Góth, M.L., Cziráj, S., Hanzély, Z., da Silva, D.A., Paulino Jr., E., Grossman, A.B., Korbonits, M., 2008. Protein western array analysis in human pituitary tumours: insights and limitations. *Endocr. Relat. Canc.* 15, 1099–1114.
- Ritvoonen, E., Pitkänen, E., Karppinen, A., Vehkavara, S., Demir, H., Paetau, A., Schalin-Jääntti, C., Karhu, A., 2017. Impact of AIP and inhibitory G protein alpha 2 proteins on clinical features of sporadic GH-secreting pituitary adenomas. *Eur. J. Endocrinol.* 176, 243–252.
- Salvatori, R., Radlan, S., Diekmann, Y., Iacovazzo, D., David, A., Gabrovská, P., Grassi, G., Bussell, A.M., Stals, K., Weber, A., Quinton, R., Crowne, E.C., Corazzini, V., Metherell, L., Kearney, T., Du Plessis, D., Sinha, A.K., Baboie, A., Lecoq, A.L., Chanson, P., Ansoorge, O., Ellard, S., Trainer, P.J., Balding, D., Thomas, M.G., Korbonits, M., 2017. In-frame seven amino-acid duplication in AIP arose over the last 3000 years, disrupts protein interaction and stability and is associated with gigantism. *Eur. J. Endocrinol.* 177, 257–266.
- Tuominen, I., Heliövaara, E., Raitila, A., Rautiainen, M.R., Mehine, M., Katainen, R., Donner, I., Aittomäki, V., Lehtonen, H.J., Ahlsten, M., Kivipeltö, L., Schalin-Jääntti, C., Arola, J., Hautaniemi, S., Karhu, A., 2015. AIP inactivation leads to pituitary tumorigenesis through defective Gαi-cAMP signaling. *Oncogene* 34, 1174–1184.