

Modulación de la patología de TDP-43 por inhibidores selectivos de TTBK1.

Rocío Benítez Fernández^{1, 2, a}, Loreto Martínez González², Vanesa Nozal García², Ángeles Martín-Requero², Ana Martínez Gil²

1. Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. 2. Grupo de Química Médica y Biológica traslacional, Departamento de Biología Físico-Química, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, 28040 Madrid, Madrid, España.

a. robenitezfdez@gmail.com

Palabras clave: esclerosis lateral amiotrófica; TDP-43; TTBK1; inhibidores; neuroprotección

Resumen

La esclerosis lateral amiotrófica es una enfermedad neurodegenerativa que cursa con la pérdida progresiva de las motoneuronas. Es una patología de origen desconocido y multifactorial que en el 97% de los pacientes se caracteriza por inclusiones citoplasmáticas de TDP-43 (proteína TAR de unión a ADN/ARN). Esta proteína se localiza principalmente en el núcleo donde desempeña funciones esenciales y relacionadas con la regulación del ARN y la plasticidad neuronal; sin embargo, en condiciones patológicas se trasloca al citoplasma donde es fosforilada, favoreciendo su agregación y la formación de depósitos citoplasmáticos responsables de la degeneración neuronal. Las quinasas involucradas en la fosforilación de TDP-43 son CK1, CDC7, TTBK2 y TTBK1, siendo esta última la diana de interés en este trabajo. TTBK1 es una tau-tubulina quinasa específica del sistema nervioso central, y recientemente, se ha demostrado en un modelo de *C. elegans* que es una de las enzimas responsables de regular la fosforilación de TDP-43. Se seleccionaron una serie de inhibidores selectivos para TTBK1 de los cuales se estudiaron sus propiedades físico-químicas in silico, su coeficiente de permeabilidad de la barrera hematoencefálica in vitro y sus efectos neuroprotectores mediante la disminución de los niveles de TDP-43 in vivo. Nuestros resultados parecen mostrar un efecto neuroprotector de los inhibidores selectivos de TTBK1 y un posible abordaje novedoso para el tratamiento de esta patología.

Cita: Benítez Fernández, Rocío; Martínez González, Loreto; Nozal García, Vanesa; Martín-Requero, Ángeles; Martínez Gil, Ana (2017) Modulación de la patología de TDP-43 por inhibidores selectivos de TTBK1. *dianas* 6 (2): e20170906. ISSN 1886-8746 journal.dianas.e20170906. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Copyright: © Benítez-Fernández R, Martínez-González L, Nozal-García V, Martín-Requero, Martínez-Gil A. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Introducción

Las enfermedades neurodegenerativas son un grupo de patologías de etiología desconocida caracterizadas por una pérdida paulatina de la funcionalidad neuronal que desemboca finalmente en la muerte celular. Su origen es multifactorial y en diversos estudios se sugiere la intervención de diversos factores como la inflamación, el estrés oxidativo y la excitotoxicidad en la aparición de estas enfermedades [1]. Dentro de estas enfermedades se encuentran, entre otras, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica. En la actualidad, el diagnóstico precoz de estos procesos neurodegenerativos es bastante complicado debido a la falta de biomarcadores y a su origen desconocido, por lo que el tratamiento es únicamente de tipo sintomático.

Esclerosis lateral amiotrófica

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad crónica y degenerativa de origen desconocido caracterizada por una pérdida progresiva de las motoneuronas localizadas en la corteza cerebral (neuronas motoras superiores), tronco del encéfalo y médula espinal (neuronas motoras inferiores) [2]. Es una patología que provoca la disfunción progresiva del sistema motor, el cual dirige, regula y mantiene la musculatura esquelética siendo el responsable del movimiento y la interacción del individuo con el entorno (andar, manipular, escribir, comer, vestirse, hablar...) [3]. La progresión de la enfermedad varía mucho entre individuos, pero generalmente al cabo de 3-5 años el aumento de la debilidad muscular conduce a la insuficiencia respiratoria y a la muerte. Es una enfermedad con una incidencia mundial anual de aproximadamente 2 casos por cada 100.000 habitantes [4]. Actualmente, no existe tratamiento curativo para la esclerosis lateral amiotrófica, por lo que el principal objetivo del tratamiento es prolongar la

supervivencia y mejorar la calidad de vida de los pacientes. El único medicamento aprobado en la actualidad es el riluzol, un antagonista de los receptores de N-metil D-aspartato (NMDA) dirigido a reducir la excitotoxicidad; sin embargo, los resultados no han sido favorables ya que no ha demostrado que sea capaz de mejorar la función motora [5].

Aunque la etiopatogenia continúa sin dilucidarse completamente; actualmente esta enfermedad se clasifica en ELA familiar (afecta entre un 5-10% de los pacientes) y ELA esporádica (afecta al 90% de los casos). La primera es debida a mutaciones en genes directamente relacionados con la degeneración de motoneuronas, mientras que en la forma esporádica se presupone un origen multifactorial [6] que pueden abarcar diversos eventos patológicos como: estrés oxidativo, excitotoxicidad por glutamato, daño mitocondrial, defecto en el transporte axonal, daño originado por los astrocitos; y apoptosis. A pesar de la etiología diversa y desconocida de la enfermedad, el 97% de los pacientes presentan un fenotipo común en los tejidos afectados: la aparición de depósitos de la proteína TAR de unión al ADN/ARN denominada TDP-43 [7].

TDP-43

TDP-43 es una proteína ubicua y muy conservada que se encuentra principalmente en el núcleo de las células, aunque es capaz de trasladarse al citoplasma. A nivel estructural, posee dos dominios de reconocimiento de ARN (RRMs), una secuencia de localización nuclear (NLS), un dominio de reconocimiento de señales de exportación nuclear y cerca del carbono terminal una región rica en glicina encargada de mediar las interacciones proteína-proteína. A nivel funcional, TDP-43 en el núcleo desempeña diversas funciones como la regulación del splicing y de la estabilidad del ARN, de la biogénesis de microARNs y de la estabilidad de sus propios mARNs, lo cual proporciona un mecanismo de autoregulación de los niveles de TDP-43. Aunque en su mayoría está localizada en el núcleo, hasta un 30% de TDP-43 puede encontrarse en el citoplasma regulado por su propia actividad y por situaciones de estrés donde es un componente clave en el transporte de ARN y en la plasticidad neuronal mediante la regulación de la síntesis de proteínas locales [7,8].

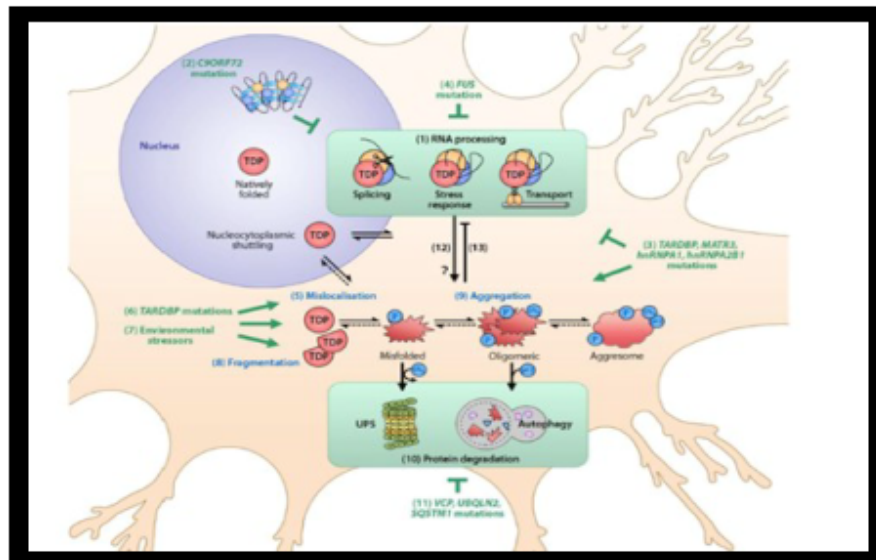


Figura 1.-Proteinopatías de TDP-43 y su relación con la patogénesis de la esclerosis lateral amiotrófica. (1) TDP-43 es una proteína de unión al ADN y al ARN localizada en el núcleo e implicada en el procesamiento del ARN. Cuando se trasloca al citoplasma está involucrada en el procesamiento de ARN citoplasmático, en la respuesta al estrés y en el transporte de ARN. (2) La mutación C9ORF72 provoca el secuestro de las proteínas de unión a ARN, lo que perjudica el procesamiento del ARN. La ELA mediada por C9ORF72 también se manifiesta con la acumulación y agregación de TDP-43. (3) Las mutaciones MATR3, hnRNPA1 y hnRNPA2B1 también afectan al procesamiento del ARN e inducen la proteinopatía TDP-43, probablemente a través de interacciones de unión directa con TDP-43 que influyen en su plegamiento y función. (4) Se cree que las mutaciones de FUS causan ELA, independientemente de la proteinopatía TDP-43. (5) La deslocalización del exceso de TDP-43 al citoplasma puede ser promovida por (6) mutaciones TARDBP y (7) factores estresantes ambientales, que también promueven (8) la fragmentación de TDP-43. (9) Las especies de TDP-43 mal localizadas son propensas a un plegamiento erróneo y a la agregación, lo que está asociado con la adición de cadenas de fosforilación y ubiquitina. (10) El sistema del proteosoma de ubiquitina (UPS) y la autofagia normalmente sirven para mantener la homeostasis de TDP-43. Sin embargo, en ELA estos sistemas de degradación de proteínas no previenen la acumulación de TDP-43. (11) Las mutaciones en VCP, UBQLN2 y SQSTM1 pueden deteriorar la degradación de proteínas. (12) El procesamiento de ARN aberrante, y particularmente la formación de gránulos de estrés, puede promover la agregación de TDP-43. (13) Por el contrario, el plegamiento erróneo y la agregación de TDP-43 deteriora la función de procesamiento de ARN.

La deposición de TDP-43 se ha detectado en las neuronas corticales en pacientes de demencia frontotemporal (FTD) y en las neuronas motoras espinales en pacientes de ELA. Estas proteinopatías de TDP-43 se caracterizan por una serie de modificaciones post-traduccionales patológicas, como ubiquitinación, fosforilación y procesamiento proteolítico, responsables de la agregación y formación de inclusiones citoplasmáticas insolubles de TDP-43 (Figura 1). La causa molecular precisa que subyace a la neurotoxicidad en la mayoría de estas proteinopatías permanece incierta; sin embargo, pueden estar involucradas tanto la pérdida de la función normal en el núcleo como hiperfunción tóxica en el citoplasma [9]. Debido a la importancia de la fosforilación de TDP-43 en la patogénesis, un posible abordaje terapéutico sería inhibir las quinasas implicadas en este proceso.

Recientemente, se ha desarrollado un modelo *C. elegans* de proteinopatía de TDP-43 que muestra una neurodegeneración y neurotoxicidad dependientes de la fosforilación de TDP-43. Este modelo ha permitido identificar cuatro quinasas implicadas en la fosforilación de TDP-43: CK1, CDC7, TTBK1 y TTBK2. Estas dos últimas proteínas fueron identificadas en último lugar y son quinasas homólogas a la tau tubulina quinasa (Figura 2) [10].

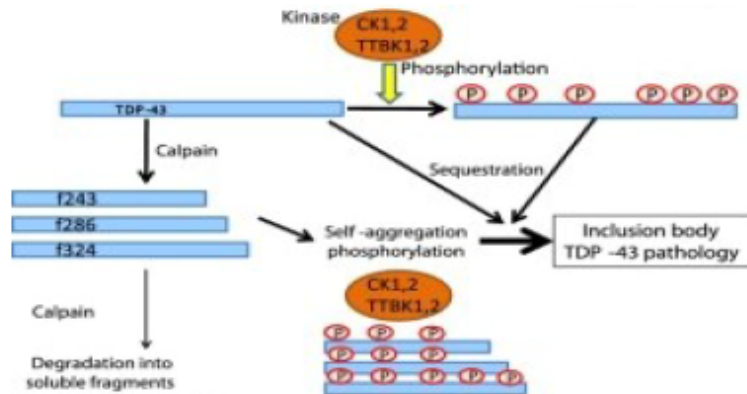


Figura 2.- Fosforilación de TDP-43 por TTBK1/2. En este proceso, está implicada también la calpaina, proteasa que genera fragmentos de TDP-43 favoreciendo su agregación y posterior fosforilación.

TTBK

La familia de tau-tubulina quinasas está formada por dos miembros TTBK1 y TTBK2, las cuales pertenecen a la superfamilia de la caseína quinasa. Estas quinasas son responsables principalmente de la fosforilación de tau y de la tubulina asociada a los microtúbulos por lo que en primer lugar están implicadas en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. Estas dos quinasas contienen un dominio quinasa altamente homólogo pero sus dominios no catalíticos son claramente diferentes. TTBK1 se expresa específicamente en el sistema nervioso central (SNC) donde participa en la fosforilación y agregación de tau; y TTBK2 se expresa de forma ubicua en múltiples tejidos siendo más alta su expresión en las células de Purkinje y en la capa de células granulares del cerebelo, hipocampo, mesencéfalo y sustancia negra; además está genéticamente implicada en la ataxia espino cerebelosa tipo 11 [11]. Diversos estudios indican la implicación de TTBK2 en embriogénesis, mitosis y supervivencia celular. En el mismo modelo de *C. elegans* donde se demostró su implicación en la fosforilación de TDP-43, se ha visto que TTBK1 induce mayor fosforilación de TDP-43 que TTBK2 [10] (Figura 3).

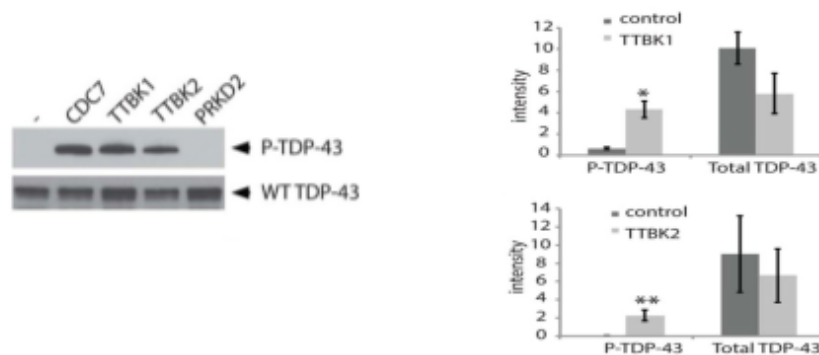


Figura 3.- Niveles de fosforilación de TDP-43 en un modelo con sobreexpresión de Tau-tubulina quinasas.

Por tanto, TTBK1 es una posible diana interesante para el tratamiento de proteinopatías de TDP-43 tanto por su implicación en la fosforilación de TDP-43 como por su expresión específica en el SNC gracias a la cual se evitarían muchos efectos secundarios. El grupo de Química Médica y Biológica traslacional del CIB-CSIC ha diseñado y sintetizado una serie de moléculas con inhibición en TTBK1, como potenciales candidatos a fármacos para el tratamiento de la ELA y otras patologías mediadas por TDP-43.

El objetivo de este trabajo es la selección de los mejores candidatos para estudios posteriores *in vivo*. Para ello, se estudiarán las propiedades físico-químicas de las diversas moléculas, principalmente, la capacidad de penetrar al SNC; el estudio de la viabilidad celular en presencia de los compuestos; la capacidad neuroprotectora frente a la muerte neuronal inducida por TDP-43 y la disminución de la fosforilación de TDP-43 en cultivos de células SH-SY5Y.

Materiales y métodos

Cultivos de células neuronales

Se utilizó la línea celular de neuroblastoma humano llamada SH-SY5Y. Esta se mantuvo en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) enriquecido con un 1% de penicilina/estreptomicina y un 10% de suero fetal bovino (FBS) en unas condiciones de 37°C más un 5% CO₂. Una vez alcanzada una confluencia óptima, las células se cultivaron en placas de 96 pocillos o de 6 pocillos según el ensayo a realizar. En todos los casos, es importante tener en cuenta que son células adherentes.

Inhibidores de TTBK1

Los inhibidores de TTBK1 (stock 10 mM) utilizados a lo largo de este trabajo fueron VNG 1.32, VNG 1.33, VNG 1.35, VNG 1.47, VNG 1.49, VNG 1.52 y VNG 1.59 diseñados computacionalmente y sintetizados en el grupo de investigación.

Propiedades físico-químicas *in silico*

Para determinar las propiedades físico-químicas de los inhibidores, se utilizó el módulo LigPrep^[12] para preparar las estructuras en un medio similar al fisiológico; y una vez obtenidas, con la herramienta QikProp^[13] implementada en el programa Maestro[®]^[14] se obtuvo una predicción de las propiedades físico-químicas tales como el coeficiente de solubilidad (QPlogS), el coeficiente de reparto en la barrera hematoencefálica (QPlogBBB), el coeficiente de reparto octanol/agua (QPlogPo/w) y la permeabilidad celular (QPPCaco).

Permeabilidad al sistema nervioso central

La capacidad de penetración de nuestros inhibidores en el SNC se evaluó mediante el método de PAMPA (Parallel artificial membrane permeability assay). Para realizar este ensayo, se utilizaron los siguientes materiales: una placa donadora (Multiscreen[®] IP Sterile Plate con una membrana PDVF cuyo poro es de 0,45 µm, ref: MAIPN4510) y otra placa aceptora de 96 pocillos (Multiscreen[®], ref: MAMCS9610) ambas de Millipore, lípido de cerebro porcino (ref: 141101, Avanti Polar Lipids[®]), se utilizan como controles fármacos en uso clínico (Sigma[®]) cuya permeabilidad hematoencefálica en humanos es conocida (cafeína, enoxacina, hidrocortisona, desipramina, ofloxacino, piroxicam, testosterona, promazina, verapamilo y atenolol), un filtro de PDVF (diámetro 30mm y un poro de 0,45 µm) de Sigma y un lector UV de placas de 96 pocillos Varioskan[™] (Thermo Fisher). El protocolo utilizado fue el siguiente: los controles y los inhibidores fueron disueltos en 1500 µl de etanol y 3500 µl de tampón fosfato salino (PBS) a pH 7.4. Estas disoluciones se filtran todas excepto los 10 controles. Se añaden 180 µl de disolución PBS/DMSO (95/5) a la placa aceptora. La placa donadora es impregnada con 4 µl de una disolución lípido de cerebro porcino en dodecano (20 mg.mL⁻¹) y 5 minutos después, se procede a cargar la placa de 96 añadiendo en cada pocillo 180µl y cada uno de los compuestos por triplicado. Una vez terminado, se pone la placa donadora encima de la placa aceptora y se dejan 2h 45 min a temperatura ambiente. Durante ese tiempo, los compuestos pasan desde la placa donadora a la aceptora a través de la membrana del lípido. Terminada la incubación, la placa donadora se retira. La concentración de los compuestos y los controles en la placa aceptora se determina empleando el lector de UV de placas de 96 pocillos Varioskan[™]. Cada muestra es analizada en el intervalo de absorbancia de cada uno de los compuestos (previamente analizado) y los resultados se presentan con su valor de desviación standard y se realiza la media de las 3 medidas tomadas. Los compuestos controles mencionados anteriormente cuya permeabilidad hematoencefálica es conocida se utilizan para validar el estudio.

Viabilidad celular

La viabilidad de los compuestos en estudio se determina a diferentes concentraciones en la línea celular SH-SY5Y para poder conocer la dosis a la cual realizar el estudio de neuroprotección. Para determinar la viabilidad celular, se realizaron ensayos de MTT. Esta técnica se basa en la reducción mitocondrial del MTT, compuesto perteneciente a la familia de sales de tetrazolio, soluble en agua y de color amarillo, a un compuesto de la familia de los formazanos, los cuales son insolubles en agua y de color violeta. Para cuantificarlo se disuelve en un disolvente orgánico como DMSO (dimetilsulfóxido) y se mide su absorbancia a 595 nm. Para la elaboración de estos experimentos, 60.000 células fueron incubadas a 37°C

(5% CO₂) con MTT (5 mg/ml) durante 2 horas. Una vez terminada la incubación, las células se lisaron con DMSO, con la finalidad de disolver los cristales de formazán formados. La lectura de la absorbancia en las células viables se midió a 595 nm. Por tanto, la cantidad de células vivas será directamente proporcional a la cantidad de formazán formado.

Estudios de neuroprotección

Para determinar el efecto neuroprotector de los inhibidores, se utilizó un modelo basado en la toxicidad celular del ácido etacrínico, midiendo la viabilidad celular con MTT tras la incubación con los diferentes compuestos. El ácido etacrínico (EA) es capaz de incrementar el estrés oxidativo mediante la depleción del glutatión, induciendo así la fosforilación del carbono terminal de la serina 403/404 y 409/410 de la proteína TDP-43^[15]. Por ello, en líneas celulares de neuronas se utiliza el EA para inducir la fosforilación de TDP-43 asemejando así uno de los procesos implicados en la patogénesis de la esclerosis lateral amiotrófica. Este ensayo consiste en: se cultivan 60.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos y se incuban 24 horas a 37°C con un 5% de CO₂. Posteriormente, se tratan con los inhibidores a una o varias concentraciones y se incuban durante 1 hora en las mismas condiciones anteriores. Por último, se añade el volumen necesario de EA para obtener una concentración final de 20µM ya que es aquella que consigue un 50% de muerte celular y se deja incuban 24 horas. Una vez terminada la incubación, se realiza el ensayo de MTT explicado en el apartado de viabilidad celular.

Western Blot

Para determinar el nivel de fosforilación de TDP-43, se realizaron ensayos de Western Blot. En primer lugar, se obtuvieron los extractos celulares de la siguiente manera: se aspiró todo el medio, se lavaron las células con PBS en frío, se recogieron y posteriormente, se lisaron durante 20 minutos en buffer de lisis (50mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 1% Nonidet P-40) al que se le añadió una mezcla de inhibidores de proteasas. Tras una centrifugación de 10 minutos a 4°C a 14000rpm para eliminar los restos celulares, se retiró el sobrenadante (proteínas) y se realizó la cuantificación de proteína de cada una de las muestras usando el kit de análisis de proteínas BCA™ (Thermo Fisher). La separación de proteínas se realizó usando el sistema SDS-PAGE. Las muestras fueron preparadas con tampón de carga 4x (TrisHCl 100mM, pH 7.4, SDS 4%, azul de bromofenol 0,2%, β-mercaptoetanol 5% y glicerol 20%) y se calentaron a 96°C durante 10 minutos. Se cargaron entre 90-100µg de proteína y la electroforesis se realizó a un voltaje de 130 mV con un amperaje constante de 0,02 A. Una vez separadas las proteínas, se transfirieron a una membrana de PVDF (polyvinylidene fluoride) de Bio-Rad mediante una transferencia húmeda. El bloqueo se hizo durante 1 hora con una solución de TTBS (TBS 1x y Tween al 0,1%) con BSA al 5%, una vez terminado, se incubó a 4°C durante toda la noche con el anticuerpo primario correspondiente. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti p-TDP43, anti TDP-43 y anti α-tubulina (Tabla 1). Posteriormente, se realizaron dos lavados de 10 minutos cada uno con TTBS y uno con TBS 1x; y se incubaron las membranas durante una hora con el anticuerpo secundario anti-rabbit en el caso de TDP-43 y anti- mouse en la α-tubulina, en una dilución 1:5000 en 50% de TTBS y 50% TBS 1x con 2% de BSA. Tras la incubación con el secundario, se realizaron dos lavados de 10 minutos cada uno con TTBS y uno con TBS 1x. Las membranas se revelaron utilizando el kit de detección ECL. Como control de carga, todas las membranas se incubaron con el anticuerpo primario anti α-tubulina. La cuantificación de las bandas se realizó mediante un estudio densitométrico utilizando el programa Image Studio Lite Ver 5.2.

Anticuerpo primario	Peso molecular	Casa comercial	Especie	Medio de dilución
TDP-43 N-Terminal	43 kDa	Proteintech	Rabbit	5% BSA en TTBS.
Phospho (409/410)-TDP-43	43 kDa	Proteintech	Rabbit	5% BSA en TTBS.
α-tubulina	55 kDa	Santa Cruz	Mouse	0,2% BSA en TTBS

Tabla 1. Especificaciones de los anticuerpos primarios utilizados en el estudio.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo con el programa GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.). El análisis cuantitativo se realizó en tres experimentos biológicamente independientes en el caso de viabilidad celular y seis para neuroprotección, calculando la media ± desviación estándar de la media (SEM) y utilizando la T de Student de muestras independientes con dos colas y con la corrección de Welch.

Resultados y discusión

Propiedades físico-químicas

Las propiedades físico-químicas de un compuesto son importantes para alcanzar una eficacia terapéutica ya que condicionan muchos de los procesos de la serie ADME (absorción, distribución, metabolismo y excreción), por lo que son de gran importancia en cuanto a su biodisponibilidad. Por ello, se hizo una

predicción de las características físico-químicas de todos los compuestos. Según esta predicción, todos los compuestos son buenos candidatos a fármacos ya que cumplen un mínimo de las especificaciones requeridas por la FDA, poseen buenas características de lipofilia y solubilidad; y atraviesan la barrera hematoencefálica (Tabla 2). Sin embargo, según la predicción de la permeabilidad celular (QPPCaco), los compuestos VNG 1.49 y VNG 1.52 tienen un menor coeficiente de permeabilidad celular lo cual podría explicar que en los ensayos de actividad celular respondan de manera diferente que aquellos compuestos con actividad enzimática *in vitro* o valores de IC₅₀ similar (Figura 4).

Moléculas	TTBK1	TTBK2	Selectividad TTBK1/ TTBK2 ^a	#stars ^b	QPlogPo/w ^c	QPlogS ^d	QPPCaco ^e	QPlogBB ^f
VNG-1.32	74% 0.79 μM	60% 1.68 μM	0.47	0	2,441	-3,102	2012,09	-0,195
VNG-1.33	79% 0.39 μM	74% 0.85 μM	0.46	1	4,045	-4,929	2011,466	-0,398
VNG-1.35	80% 0.52 μM	70% 1.32 μM	0.39	0	2,583	-3,308	2011,779	-0,274
VNG-1.47	80% 0.24 μM	63% 4.22 μM	0.06	1	4,536	-5,666	2011,227	-0,239
VNG-1.49	86% 1.71 μM	51% 11.92 μM	0.14	1	3,267	-4,735	796,198	-0,822
VNG-1.52	71% 0.65 μM	40% 4.94 μM	0.13	0	3,552	-4,972	524,984	-0,995
VNG-1.59	87% 0.77 μM	71% 3.02 μM	0.25	1	4,279	-5,291	2011,58	-0,29

Tabla 2.- Propiedades físico-químicas y valores de IC₅₀ para TTBK1 y TTBK2 de los compuestos estudiados. ^aCoefficiente de selectividad de los inhibidores con respecto a TTBK1 siendo más selectivos aquellos más cercanos a 0 y equipotentes con TTBK2 aquellos cercanos a 1. ^b#star: número de propiedades tipo fármaco que no cumplen las especificaciones establecidas por la FDA para ser candidato a fármaco. Intervalo #star (1-5), ^cQPlogPo/w: coeficiente de reparto de octanol/agua. Intervalo (-2.0-6.5), ^dQPlogS: coeficiente de solubilidad, Intervalo (-6.5-0.5), ^eQPPCaco: predicción de la permeabilidad celular en nm/sec (<25 mala, >500 buena). ^fQPlogBB: coeficiente de reparto cerebro/sangre. Intervalo (-3.0-1.2).

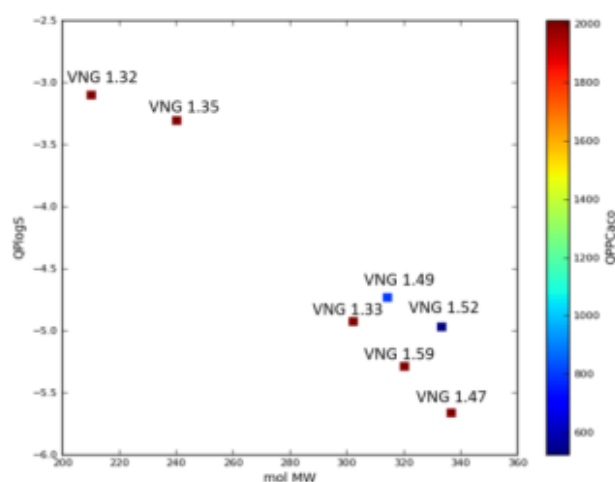


Figura 4.- Representación peso molecular frente a solubilidad. El código de colores indica la permeabilidad en células Caco, siendo el azul el menos permeable y el rojo el más permeable.

Predicción de la capacidad de penetración al Sistema Nervioso Central

La diana de estos inhibidores es una enzima localizada principalmente en el SNC por lo que es esencial que sean capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE). Aunque la herramienta QikProp pronosticaba que todos los compuestos atravesaban la BHE, al calcular coeficientes de reparto en la BHE aceptables, este hecho se comprobó experimentalmente mediante un estudio de permeabilidad utilizando membranas

artificiales paralelas (PAMPA). En este estudio se utilizan diferentes fármacos en uso humano cuya penetración cerebral es conocida y con ellos se genera la recta de calibrado, recogida en la figura 5.

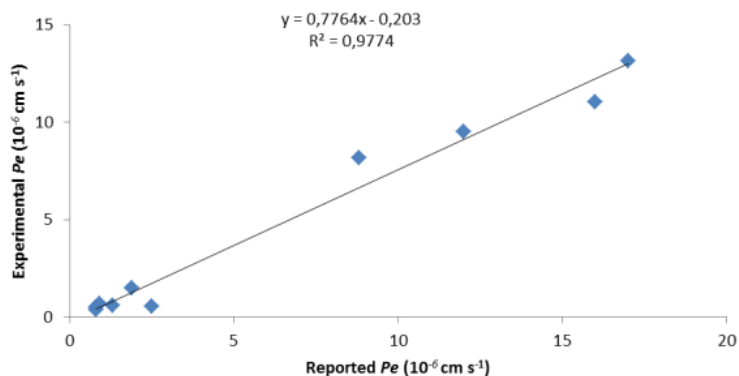


Figura 5.- Recta de calibrado del ensayo de PAMPA. Se representan los valores de los controles recogidos de la literatura frente a los obtenidos en el experimento.

A partir de ella, y teniendo en cuenta la permeabilidad experimental aparente determinada para cada compuesto, se determina si el compuesto en estudio será capaz de atravesar la BHE (SCN+), está en el intervalo de duda (SCN±) o no atravesará (SCN-). Los datos se encuentran en la Tabla 3 y todos los compuestos inhibidores de TTBK1 mostraron valores compatibles con una buena penetración al SNC excepto el derivado VNG-1.35 cuyo valor de permeabilidad le sitúa en el intervalo de duda.

CÓDIGO	Pe teóricos	Pe experimental	PERMEABILIDAD SCN
Atenolol	0,8	0,52	
Cafeína	1,3	0,61	
Desipramina	12	9,51	
Enoxacino	0,9	0,66	
Hidrocortisona	1,9	1,49	
Ofloxacino	0,8	0,38	
Piroxicam	2,5	0,55	
Promazina	8,8	8,19	
Testosterona	17	13,17	
Verapamilo	16	11,05	
VNG-1.32		3,94	SCN +
VNG-1.33		23,26	SCN +
VNG-1.35		2,58	SCN ±
VNG-1.47		11,58	SCN+
VNG-1.49		6,89	SCN +
VNG-1.52		4,75	SCN +
VNG-1.59		15,63	SCN +

Tabla 3.- Valores del coeficiente de permeabilidad (Pe) obtenidos en el PAMPA.

Viabilidad celular

Antes de empezar con los ensayos de la actividad biológica, se realizaron estudios de viabilidad celular para poder determinar la concentración a la cual llevar a cabo este estudio, al no ser tóxicos para las células. Por ello, se ensayaron tres concentraciones diferentes de todos los compuestos (10 μ M, 5 μ M y 1 μ M). Todos los compuestos a 10 μ M mostraron una disminución de la viabilidad celular, mientras que a una concentración de 5 μ M todos los compuestos a excepción de VNG 1.59 muestran una viabilidad similar al control. Evidentemente, todos aquellos que mostraron una viabilidad semejante a la del control a 5 μ M siguen mostrándola a 1 μ M. Sin embargo, el VNG 1.59 es un compuesto citotóxico ya que a ninguna concentración consigue asemejarse al control (Figura 6). Por ello, en este primer screening el compuesto VNG 1.59 fue descartado, y se eligió la concentración de 5 μ M para el estudio de eficacia.

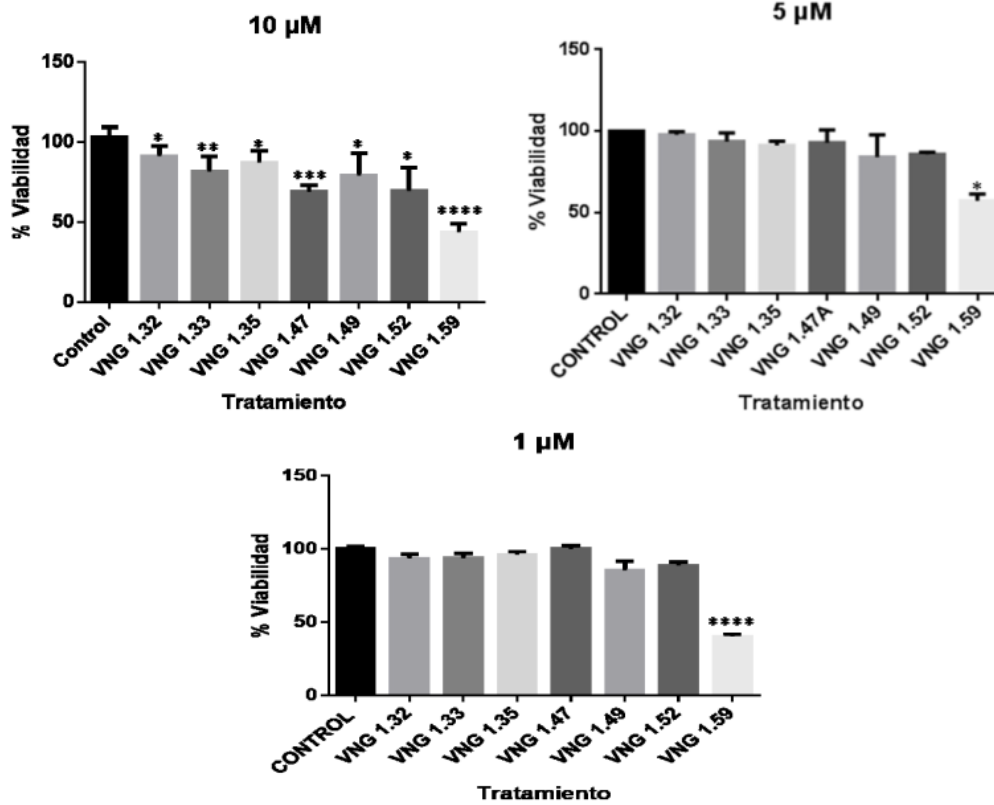


Figura 6.-Viabilidad celular. Estudio de la citotoxicidad de los inhibidores a tres concentraciones distintas con respecto al control. Los datos que se muestran son la media ± SEM de tres experimentos independientes llevados a cabo en la línea celular SH-SY5Y. (* p<0,05; ****p<0,0001 diferencias significativas con respecto al control).

Neuroprotección

Los inhibidores resultantes del primer screening se ensayaron para determinar su efecto neuroprotector; es decir, si eran capaces de revertir el efecto producido por el ácido etacrínico. Si bien los derivados VNG 1.32 y VNG 1.35 mostraron una tendencia a la neuroprotección, únicamente es capaz de contrarrestar el efecto del ácido etacrínico de manera significativa el compuesto VNG 1.47 (Figura 7).

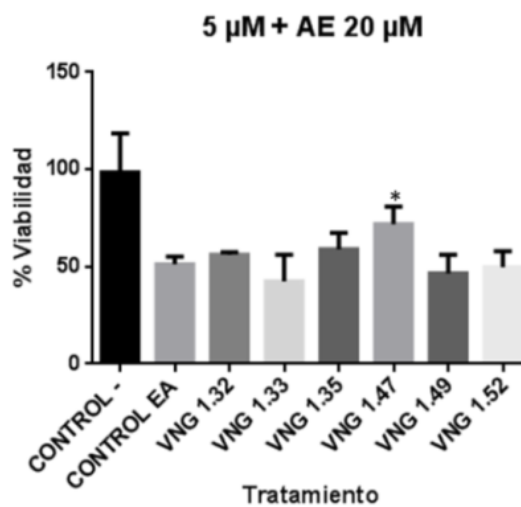


Figura 7.-Neuroprotección. Estudio de la capacidad de los inhibidores de revertir el efecto del ácido etacrínico. Los datos que se muestran son la media ± SEM de seis experimentos independientes llevados a cabo en la línea celular SH-SY5Y. (*p<0,05 diferencias significativas con respecto al control con ácido etacrínico).

Niveles de TDP-43

Por último, se estudió la variación en los niveles de TDP-43 fosforilada en presencia de VNG 1.47 con respecto al control con ácido etacrínico. Mediante la técnica Western Blot, se obtuvieron los niveles de fosforilación de TDP-43 no sólo en el caso de VNG-47 sino también en presencia del resto de inhibidores para validar los resultados obtenidos del screening de neuroprotección. El único compuesto que mostró una reducción de la fosforilación de TDP-43 fue el compuesto VNG 1.47 (Figura 8 y 9), que fue el único con efecto neuroprotector en el ensayo de ácido etacrínico. Cabe mencionar que la presencia de ácido etacrínico en el cultivo celular aumenta la fosforilación de TDP-43 (Figura 8 y 9).

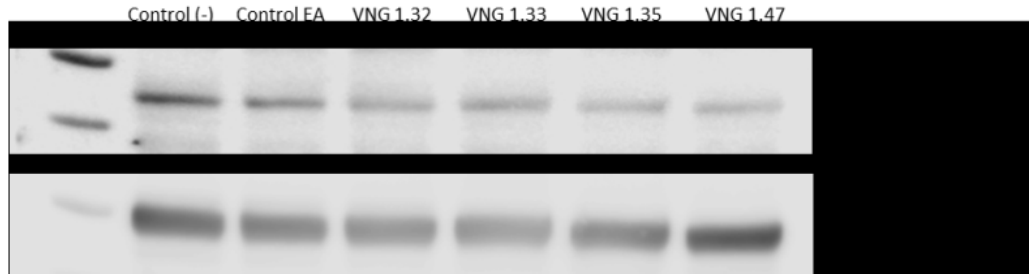


Figura 8.- Western-blot. Niveles de TDP-43 fosforilada y su control de carga.

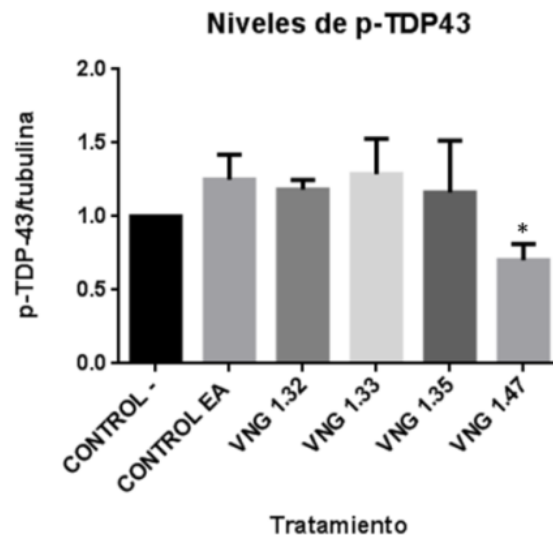


Figura 9.- Niveles de TDP-43 fosforilada por Western-Blot. Los datos que se muestran son la media \pm SEM de seis experimentos independientes llevados a cabo en la línea celular SH-SY5Y. (* $p < 0,05$ diferencias significativas con respecto al control con ácido etacrínico (EA)).

Conclusiones

Durante el desarrollo de este estudio, se ha estudiado la acción de siete compuestos con valores de IC_{50} frente a TTBK1 similares en la fosforilación de TDP-43. Los compuestos con una menor IC_{50} deberían tener efectos neuroprotectores semejantes. Sin embargo, los resultados experimentales mostraron que el único compuesto capaz de contrarrestar el efecto con el ácido etacrínico y reducir la fosforilación de TDP-43 es el VNG 1.47. Analizando los datos de inhibición sobre TTBK1 y TTBK2 de los compuestos (Tabla 2), se observa que, aunque los valores de IC_{50} en TTBK1 son similares, no ocurre lo mismo con los valores de IC_{50} sobre TTBK2 y por tanto su selectividad no es la misma. El compuesto más selectivo en TTBK1, es VNG 1.47, es decir el único que presenta efecto neuroprotector. Por ello, ante la falta de información actual sobre la fisiología de TTBK1 y TTBK2, sugerimos que la inhibición de TTBK2 pueda ser perjudicial para la célula. Recientemente, se ha visto que mutaciones en TTBK2 en pacientes con ataxia espinocerebelar tipo 11, inducen la muerte celular [16]; lo que podría confirmar esta hipótesis. Siguiendo este razonamiento, únicamente VNG 1.47 es un potencial candidato a fármaco ya que es el único con una alta selectividad y permeabilidad celular. Diversos estudios están en curso, para comprobar esta propuesta.

En este proyecto se ha demostrado que inhibiendo TTBK1 se consiguen reducir los niveles de TDP-43 fosforilada; por tanto, los inhibidores selectivos de esta enzima constituyen una potencial estrategia terapéutica para las proteinopatías de TDP-43. Asimismo, se refleja la importancia de optimizar la relación entre las propiedades farmacocinéticas y las farmacodinámicas para la obtención de potenciales candidatos a fármaco ya que hemos visto que compuestos con actividad enzimática muy similar provocan efectos muy distintos debido a cambios en la permeabilidad celular o en la selectividad.

De manera preliminar puede concluirse que VNG 1.47 es un potencial candidato a fármaco con propiedades tipo fármaco e inhibición selectiva frente a TTBK1. Estudios posteriores probarán la eficacia de este fármaco en células de pacientes con ELA y otras proteinopatías mediadas por TDP-43.

Bibliografía

1. G.G. Ortiz, F.P. Pacheco-Moisés, M. Mireles-Ramírez, L.J. Flores-Alvarado, H. González-Usigli, V.J. Sánchez-González, A.L. Sánchez-López, L. Sánchez-Romero, E.I. Díaz-Barba, J.F. Santos-Gutiérrez, P. Rivero-Moragrega P. Oxidative Stress: Love and Hate History in Central Nervous System. *Adv Protein Chem Struct Biol.* (2017) 108:1-31.
2. J. Sreedharm and R.H. Brown Jr. Amyotrophic lateral sclerosis: Problems and prospects. *Ann. Neurol.* (2013) 74:309-316.
3. C. Tard, L. Defebvre, C. Moreau, D. Devos, V. Danel-Brunaud. Clinical features of amyotrophic lateral sclerosis and their prognostic value. *Rev Neurol (Paris).* (2017) 173(5):263-272.
4. G. Logroscino, B.J. Traynor, O. Hardiman, A. Chiò, D. Mitchell, R.J. Swingler, A. Millul, E. Benn, E. Beghi. Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (2010) 81(4):385-90.
5. C.H. Zapata-Zapata, E. Franco-Dager, J.M. Solano-Atehortúa, L.F. Ahunca-Velásquez Esclerosis lateral amiotrófica: actualización. *Latreia,* (2016) 29(2): 194-205.
6. J. Riancho, I. Gonzalo, M. Ruiz-Soto, J. Berciano. ¿Por qué degeneran las motoneuronas? En *Actualización en la patogenia de la esclerosis lateral amiotrófica.* Neurología, Elsevier, (2016) España. Doi: 10.1016/j.nrl.2015.12.001.
7. E.L. Scotter, H.J. Chen, C.E. Shaw. TDP-43 proteinopathy and ALS: insights into disease mechanisms and therapeutic targets. *Neurotherapeutics* (2015) 12:352–363.
8. W. Ji-Wu, R.B. Jonathan, T. Andrew, A.S. Neil, D.M. Brian. The ALS- associated protein FUS and TDP-43 function together to affect *Drosophila* locomotion and life span. *J.Clin. Inves.* (2011) 121: 4118-4126.
9. C. Alquezar, I. G Salado, Ana de la Encarnación, D.I. Pérez, F. Moreno, C. Gil, A. López de Munain, A. Martínez, A. Martín-Requero. Targeting TDP-43 phosphorylation by casein Kinase-1 δ inhibitors: a novel strategy for the treatment of frontotemporal dementia. *Molecular Neurodegeneration* (2016) 11:36.
10. N.F. Liachko, P.J. MacMillan, T.J. Strovos, E. Loomis, L.Greenup, J.R. Murrell, B.Ghetti, M.A. Raskind, T.J.Montine, T.D. Bird, J.B. Leverenz, B.C. Kraemer. The Tau Tubulin Kinases TTBK1/2 Promote Accumulation of Pathological TDP-43. *PLoS Genet* (2014) 10(12): e1004803.
11. S. Ikezu, T. Ikezu. Tau-tubuline kinase. *Frontiers in Molecular Neuroscience* (2014); 7:33. doi: 10.3389/fnmol.2014.00033.
12. Schrödinger release 2016-4: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016.
13. Schrödinger release 2016-4: QikProp, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016.
14. Maestro versión 11.0.015 release 2016-4, Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016.
15. Y. Iguchi, M. Katsuno, S. Takagi, S. Ishigaki, J.I. Niwa, M. Hasegawa, F. Tanaka, G. Sobue. Oxidative stress induced by glutation depletion reproduces pathological modifications of TDP-43 linked to TDP-43 proteinopathies. *Neurobiology of Disease* (2012) 45:62–870.
16. J.C. Liao, T.T Yang, R.R. Weng, C.T. Kuo, C.W. Chang. TTBK2: A Tau protein kinase beyond tau phosphorylation. *BioMed Res Int* (2015), 2015:575170. Doi: 10.1155/2015/575170.