

Buscando blancos terapéuticos para las enfermedades neurodegenerativas

Pin 1 y tau en la mira

Laura Morelli, Eduardo M Castaño
Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (IQUIFIB)
CONICET- Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

Un grupo numeroso de enfermedades que afectan el sistema nervioso central, entre las que se encuentra la enfermedad de Alzheimer, se caracterizan por la aparición en las neuronas de agregados insolubles cuyo principal componente es una proteína llamada tau. El estudio de los mecanismos que dan lugar a la formación de estos agregados puede contribuir al desarrollo de procedimientos para prevenir o curar las enfermedades asociadas a ellos, las que hasta ahora carecen de tratamientos eficaces.

Un conjunto de muy distintas enfermedades neurodegenerativas tienen en común el estar asociadas a la aparición en el cerebro de agregados insolubles de proteínas. Entre estas enfermedades se incluyen tanto las que se presentan esporádicamente como aquellas que por ser hereditarias aparecen en por lo menos un individuo de cada generación de una familia. Dentro de estas enfermedades, esta nota tratará de las 'tauopatías' caracterizadas porque el agregado insoluble se forma en el interior de las neu-

ronas y está constituido principalmente por una proteína designada como *tau*. Las 'tauopatías' dan lugar a demencias, esto es, un deterioro progresivo e irreversible de las funciones mentales. La demencia es causada por muchas enfermedades, algunas muy infrecuentes como la enfermedad de Pick y/o la demencia frontotemporal, en las que el gen que codifica para *tau* presenta mutaciones y otras mucho más frecuentes como la enfermedad de Alzheimer en la que no hay alteraciones genéticas de *tau*.

Tau es una proteína compleja

En el sistema nervioso central existen seis variedades (isoformas) de *tau* que resultan de diferentes combinaciones de su material genético. *Tau* en las neuronas es la principal representante de las proteínas asociadas a los microtúbulos llamadas habitualmente 'MAP' (el acrónimo de *Microtubule-Associated Proteins*). Los microtúbulos forman parte del citoesqueleto, que es una red de filamentos y túbulos de proteínas presente en el citoplasma de la mayoría de las células. El citoesqueleto contribuye a dar forma a las células e interviene en la correcta separación de los cromosomas durante la división celular. En las neuronas los microtúbulos participan también en la formación de las prolongaciones típicas de estas células (axón y dendritas) y en el transporte de sustancias a través de estas prolongaciones.

La estabilidad estructural de los microtúbulos depende entre otros factores de la eficiencia de la unión de *tau* a ellos. Esta unión a su vez es modulada por la asociación de fosfato a *tau*. Este proceso, llamado fosforilación, resulta de la actividad de dos grupos de enzimas: las *quinasas* que catalizan la transferencia de fosfato a la proteína a partir de moléculas que lo contienen (por ejemplo la adenosina trifosfato [ATP]). La acción de estas enzimas es revertida por las *fosfatasas* que promueven la defosforilación al catalizar la transferencia al agua del fosfato unido a la proteína. El balance de la acción de las *quinasas* y *fosfatasas* determina la cantidad de fosfato unido a *tau* (nivel de fosforilación). Este es mayor cuando *tau* no está unida a los microtúbulos, estado en el cual *tau* tiene una alta tendencia a formar agregados. Como ya se mencionó, esto está asociado a la neurodegeneración; por este motivo el estudio del mecanismo de la regulación del nivel de fosforilación y en particular de las *quinasas* y *fosfatasas* que participan en mantenerlo ha cobrado particular interés ya que podría proporcionar la base para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Este tipo de estudios debe tener en cuenta que si bien se ha descrito un gran número de *quinasas* y *fosfatasas* capaces de interactuar con *tau* in

vitro y se ha demostrado que algunas de ellas están presentes en el cerebro humano, no se conoce aún el papel que desempeñan *in vivo*.

La deficiencia de Pin 1: ¿un modelo animal de 'tauopatía'?

Mediante los procedimientos de ingeniería genética se han logrado cepas de ratones que expresan el gen de la *tau* humana con mutaciones que según el caso producen enfermedades hereditarias y/o dan lugar a variantes de *tau* que, en conjunción con factores ambientales y de otros genes asociados aún no identificados, inician procesos patológicos en regiones específicas del cerebro.

Otra estrategia para el desarrollo de 'tauopatías' mediante ingeniería genética es obtener animales que forman un exceso de proteínas que promueven la fosforilación de *tau*. Por ejemplo, se han logrado ratones transgénicos que producen un exceso de la forma presente en humanos de una proteína que activa las *quinasas* llamada *p25*. Estos ratones desarrollan alteraciones en la estructura y en la función del citoesqueleto pero no acumulan en el cerebro formas insolubles de *tau* excesivamente fosforilada.

Kung Ping Lu y colaboradores de la Universidad de Harvard presentaron recientemente un modelo animal en el que la eliminación de un gen está asociada a la neurodegeneración y la acumulación de *tau* excesivamente fosforilada. El gen anulado es el que codifica para la síntesis de la enzima *peptidilprolil cys/trans isomerasa* (*Pin 1*). Esta enzima está altamente conservada en la evolución y es considerada una de las proteínas que regulan la división celular. Los ratones deficientes en *Pin 1* (*Pin 1^{-/-}*) presentan, conforme envejecen, alteraciones motoras y de comportamiento, una profunda disminución en el número de neuronas, una marcada acumulación intracelular de proteína *tau* agregada y la degeneración de sus prolongaciones neuronales. Los autores demostraron que *Pin 1* interactúa en forma única y específica con la forma fosforilada del aminoácido treonina que ocupa la posición 231 en la secuencia de aminoácidos de *tau*, cambiando su estructura tridimensional. Esto promueve la defosforilación por la acción de las *fosfatasas* ya que estas enzimas solo actúan cuando *tau* adquiere la conformación que resulta de su unión a *Pin 1*.

Para comprobar si algo similar ocurría en el cerebro humano, los mismos investigadores analizaron regiones de cerebros provenientes de individuos normales y de pacientes afectados por la enfermedad de Alzheimer esporádica. En los primeros, las regiones con menor cantidad de *Pin 1* correspondían a las áreas más susceptibles a la

muerte neuronal. En los casos de enfermedad de Alzheimer, el 70 por ciento de las neuronas que presentaban bajos niveles de Pin 1 tenían agregados de proteína *tau* hiperfosforilada. Para los autores, estos agregados 'capturarían' a la enzima Pin 1 soluble sustrayéndola del citoplasma y disminuyendo así su actividad. Postulan entonces que Pin 1 es una enzima crítica para proteger a las neuronas de la muerte dependiente del envejecimiento y que, por lo tanto, las neuronas deficientes en Pin 1 serían muy vulnerables a la degeneración. Sobre la base de estas observaciones sugieren abordar nuevos tratamientos tendientes a estimular los niveles o la actividad de Pin 1 con el objetivo de favorecer la desfosforilación de *tau*.

Sin embargo, los efectos biológicos de la deficiencia de Pin 1 parecen ser mucho más complejos que los ya mencionados. Investigadores de la Uni-

versidad de Waseda en Japón demostraron en 1999 que los ratones con deficiencia de Pin 1 (-/-) se desarrollaban normalmente pero que algunas de sus células (los llamados *fibroblastos*) tenían una menor capacidad de proliferar debido a un ingreso retrasado a una de las fases (G1) del ciclo celular. Más tarde se comprobó que estas alteraciones eran las mismas que tenía el ratón deficiente en la ciclina D1 que es una proteína clave para la división celular. Si bien en el curso de estos experimentos no se analizaron las alteraciones que ocurrían en el cerebro de estos ratones durante el envejecimiento, los autores propusieron que Pin 1 era crucial para la correcta función de ciclina D1 y la consiguiente progresión del ciclo celular en células de mamíferos.

La compleja relación de Pin 1 con el ciclo celular se hizo más evidente cuando se demostró que esta es necesaria para la actividad del supresor tumoral p53, que se induce luego de dañar el ADN. Se sabe, además, que p53 regula la respuesta neuronal al estrés y que su inhibición específica podría proteger las neuronas de los efectos de la privación de nutrientes y de la insuficiencia de oxígeno.

Estas observaciones indican, por lo tanto, que la deficiencia de Pin 1 no solo aumenta la fosforilación de *tau*, sino que también compromete la función normal de ciclina D1 y de p53. Una mayor actividad de estas últimas provocada por una mayor actividad de Pin 1 podría tener efectos negativos sobre la neurona adulta cancelando el posible efecto protector derivado de su acción sobre la desfosforilación.

Las enfermedades neurodegenerativas y el ciclo celular

Una de las hipótesis actuales para explicar por qué hay pérdida masiva de neuronas en algunas enfermedades neurodegenerativas postula que, frente a ciertos estímulos nocivos, las neuronas inician un programa 'inadecuado' para reingresar a una fase proliferativa con la intención de reparar los posibles daños, pero debido a su alto grado de diferenciación, son incapaces de llevar a cabo el programa y terminan muriendo por apoptosis dejando a los ovillos de *tau* hiperfosforilada en el citoplasma neuronal. En la enfermedad de Alzheimer existen numerosas evidencias experimentales que sugieren que ciertas poblaciones de neuronas susceptibles tienen el ciclo celular 'reactivado'. La salida del estado quiescente se manifiesta de diversas formas incluyendo la expresión en el cerebro de ciclinas, quinasas dependientes de ciclinas y sus correspondientes inhibidores, el reclutamiento de componentes de las vías de señalización de activadores de la división celular y el incremento en la transcripción

de diversas proteínas relacionadas con la mitosis.

Aunque las causas de esta aparente re-entrada al ciclo celular no están definidas, las consecuencias para las neuronas son fatales incluyendo estrés oxidativo, anormalidades en el citoesqueleto, mal funcionamiento mitocondrial y, finalmente, muerte celular.

¿Existen perspectivas terapéuticas?

Al promover directamente la desfosforilación de *tau* Pin 1 tendría efecto neuroprotector mientras que al estimular los mecanismos de división celular en las neuronas adultas favorecería la muerte celular. Los resultados opuestos de estos efectos complican la posible modulación farmacológica de la actividad de esta enzima ya que plantean las preguntas: ¿Qué es peor para la neurona, la fosforilación excesiva de *tau* o la entrada aberrante al ciclo celular? ¿Es correcto pensar que la inducción de la desfosforilación no afecta a otras proteínas indispensables para la activación de cascadas de señalización? ¿Se logrará modular la actividad de quinasas y fosfatasa dependiendo del sustrato? ¿Se podrá limitar el efecto farmacológico al órgano afectado, en este caso, el cerebro?

Encontrar nuevos blancos para la acción de drogas eficaces en el tratamiento o prevención de enfermedades tan complejas como lo es la de Alzheimer resulta de interés multidisciplinario y desafía la búsqueda de estrategias alternativas que, no solo retrasen o prevengan la enfermedad, sino que superen posibles efectos colaterales indeseables.



Eduardo Castaño
Médico, Facultad de Medicina, UBA. Investigador Independiente, CONICET. Profesor *ad honorem*, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.



Laura Morelli
Doctora en Bioquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (IQUIFIB), Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

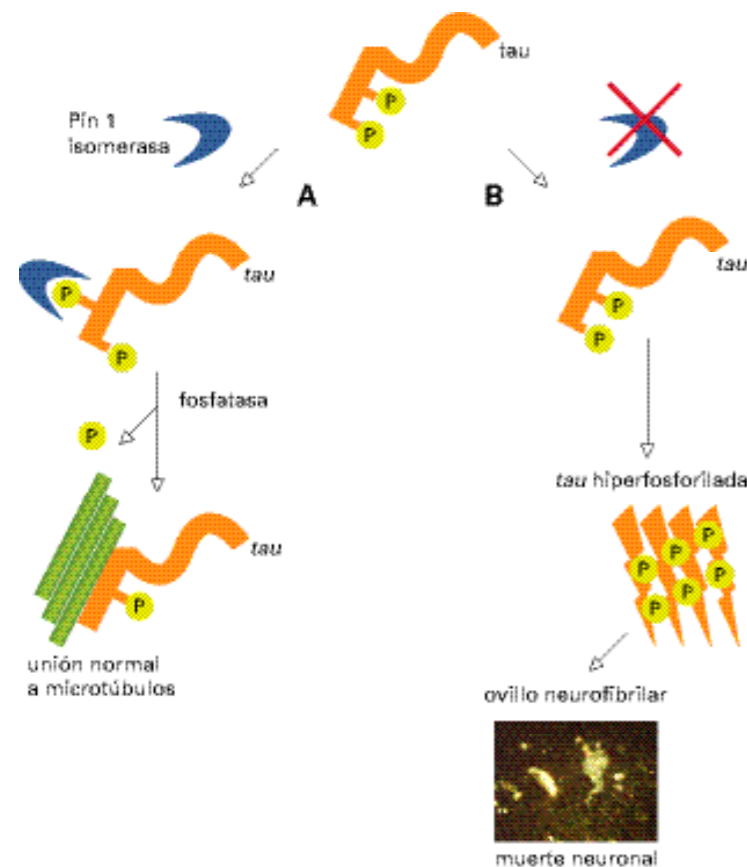


Figura 1. Esquema que representa la interacción de Pin 1 con *tau*. En condiciones normales (A), Pin 1 está disponible para unirse a *tau* y promover la remoción enzimática de fosfato. *Tau*, normalmente fosforilada por el balance entre quinasas y fosfatasa, puede asociarse a microtúbulos y se mantiene la integridad del esqueleto celular. En ausencia o deficiencia de Pin 1 (B), *tau* persiste excesivamente fosforilada, no interacciona con microtúbulos y se agrega dentro de la célula formando los llamados ovillos neurofibrilares (foto). Estos, a su vez, se asocian con muerte neuronal.

Lecturas sugeridas

FUJIMORI F, TAKAHASHI K, UCHIDA C y UCHIDA T, 1999, 'Mice lacking Pin 1 develop normally but are defective in entering cell cycle from G0 arrest', *Biochem Biophys Res Commun*, 265: 658-663
 HAMDANE M, SMET C, SAMBO AV, LEROY A, WIERUSZESKI JM, DELOBEL P, MAURAGE CA, GHESTEM A, WINTJENS R, BEGARD S, SERGEANT N, DELACOURTE A, HORVATH D, LANDRIEU I, LIPPENS G, BUEE L, 2002, 'Pin 1: a therapeutic target in Alzheimer neurodegeneration', *J. Mol. Neurosci.*, 19:275-87.
 LEE V, GOEDERT M y TROJANOSKI JQ, 2001, 'Neurodegenerative tauopathies', *Annu. Rev. Neurosci.*, 24:1121-159.
 LLOU Y-C, SUN A, RYE A, ZHOU XZ, YU Z-X, HUANG H-K, UCHIDA T, BRONSON R, BING G, LI X, HUNTER T y LU KP, 2003, 'Role of the prolyl

isomerase Pin 1 in protecting against age-dependent neurodegeneration', *Nature*, 424: 556-561.
 LU P-J, WULF G, ZHOU XZ, DAVIES P y LU KP, 1999, 'The prolyl isomerase Pin 1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein', *Nature*, 399:784-788.
 ZHENG H, YOU H, ZHOU XZ, MURRAY SA, UCHIDA T, WULF G, GU L, TANG X, LU KP, XIAO ZX, 2002, 'The prolyl isomerase Pin 1 is a regulator of p53 in genotoxic response', *Nature*, 419:849-53.