

**FACULTAD DE MEDICINA**  
Departamento de Anatomía,  
Histopatología y Neurociencia



Relación estructura-función  
del prionoide humano CPEB3  
en la consolidación de la memoria

· **TESIS DOCTORAL** ·

**PRESENTADA POR**  
Daniel Ramírez de Mingo

**DIRECTORES**  
Mariano Sixto Carrión Vázquez  
Douglas Vinson Laurents

**Madrid, 2020**



DOCTORADO EN NEUROCIENCIA UAM

***Relación estructura-función  
del prionoide humano CPEB3  
en la consolidación de la memoria***

Memoria de la TESIS DOCTORAL presentada por D. Daniel  
Ramírez de Mingo, Licenciado en Bioquímica,  
para optar al grado de:

Doctor en Neurociencia

Directores

Dr. Mariano Sixto Carrión Vázquez

Dr. Douglas Vinson Laurents

El presente trabajo de tesis doctoral ha sido realizado en  
el Departamento de Neurobiología Molecular, Celular y del Desarrollo  
del Instituto Cajal (CSIC) y el Departamento de Química Física Biológica  
del Instituto de Química-Física Rocasolano (CSIC).

En Madrid, a 10 de septiembre de 2020

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, debo agradecer a mi director Mariano Sixto Carrión Vázquez haberme concedido la oportunidad de realizar la tesis doctoral en su grupo de investigación y financiar mi proyecto, aportando siempre los medios necesarios para su realización. Al mismo tiempo, quiero mostrar de forma especial mi más sincero agradecimiento a mi director Douglas Vinson Laurents por haberme permitido el privilegio de trabajar estrechamente con él, enriqueciéndome día a día como persona e investigador, así como por su generosidad, el trato excelente y la inconmensurable ayuda que he recibido siempre. También agradezco al Instituto Cajal y el Instituto de Química-Física Rocasolano el acceso a los laboratorios y los equipos empleados para realizar el presente trabajo de investigación.

Quiero agradecer destacando el apoyo técnico recibido de Silvia Fernández, Andrea Collado y Emilio Tejera de la Unidad de Biología Molecular y Celular, de María del Carmen Hernández y Belén García de la Unidad de Imagen Científica y Microscopía, de Ricardo Martínez y Martin Maher de la Unidad de Microscopía Electrónica, de José Luis Martínez de la Unidad de Citometría de Flujo y de Laura Barrios de la Unidad de Estadística, así como del resto de unidades y servicios por el que mi investigación se ha visto favorecida.

También deseo expresar mi gratitud a todos mis talentosos compañeros con los que he compartido mi trabajo científico a lo largo de estos años Rubén Hervás, Albert Galera, María del Carmen Fernández, Andrés Vera, María Eugenia Vaquero, Paula López y María del Mar Tejero por haber tenido el privilegio de colaborar y aprender siempre de ellos.

Por último, quiero destacar la admiración que siento por mi familia y amigos agradeciéndoles todo el cariño y el apoyo incondicional recibidos durante esta etapa de mi vida sin los cuales no hubiera podido llegar hasta aquí.

*A mi familia*

*“El amor nace del recuerdo,  
vive de la inteligencia  
y muere por olvido”*

RAMON LLULL  
1232-1316

## RESUMEN

El descubrimiento de los condensados biomoleculares formados mediante la separación de fases líquido-líquido por parte de ciertas proteínas como las intrínsecamente desordenadas, que carecen de estructura estable en condiciones fisiológicas, ha supuesto un cambio de paradigma en la visión imperante de la secuencia, estructura y función de las proteínas. Esta tesis busca ampliar el conocimiento actual sobre las transiciones físico-químicas de estas proteínas mediante el estudio del amiloide funcional CPEB3 de humano (hCPEB3), implicado en la consolidación de la memoria. hCPEB3 es una proteína prionoide de unión a ARN cuya forma agregativa tiene un papel clave en la activación de la traducción de proteínas que regulan la plasticidad sináptica en el hipocampo. En su estado inactivo, hCPEB3 forma parte de los gránulos neuronales que reprimen la traducción de ARN requerida para la memoria a largo plazo.

Las principales técnicas usadas para entender las bases moleculares de las funciones biológicas de esta proteína han sido la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) de alta resolución en disolución, así como métodos computacionales y técnicas biofísicas.

Para comprender en detalle su función, se han determinado las conformaciones preferentes y la dinámica de su región N-terminal intrínsecamente desordenada mediante espectroscopía de RMN. Con 426 residuos, se trata de la segunda región intrínsecamente desordenada más larga estudiada con detalle atómico hasta la fecha. En primer lugar, se realizó la asignación de esta región usando una estrategia no convencional. Utilizando los desplazamientos químicos, se calculó un ensamble de confórmeros representativos para los segmentos que presentan estructuras preferenciales.

Por otra parte, a partir del análisis de la secuencia utilizando herramientas bioinformáticas, se han caracterizado la separación y transición de fases de hCPEB3 mediante el uso de técnicas biofísicas y microscopía, tanto *in vitro* como en células neuronales. Además, los estudios sobre la interacción de hCPEB3 con el amiloide  $A\beta_{42}$ , la chaperona Hsp70 y el péptido inhibidor de poliglutamina 1 (QBP1) han complementado la comprensión de las interacciones que modulan la formación de amiloide.

Los resultados obtenidos revelan diferencias interesantes entre los amiloides funcionales y patológicos; por ejemplo, los residuos de prolina actúan como “guardianes” en los primeros y se encuentran ausentes en estos últimos. Todos estos descubrimientos han permitido proponer un modelo para la regulación de la amiloidogénesis de hCPEB3 de acuerdo con su función en la consolidación de la memoria. La regulación de este proceso es sofisticada e implica la interacción de diferentes elementos de su secuencia distantes entre sí.

## SUMMARY

The discovery of biomolecular condensates formed via liquid-liquid phase separation by certain proteins like intrinsically disordered proteins, which lack a stable structure under physiological conditions, has changed long standing paradigms on the relationships between protein sequence, structure and function. This thesis seeks to better our understanding of the physical chemistry bases of these proteins' phase transitions by studying human CPEB3 (hCPEB3), a functional amyloid implicated in memory consolidation. hCPEB3 is a prionoid protein which binds RNA whose aggregated form plays a key role in activating the translation of proteins that regulate synaptic plasticity in the hippocampus. In its inactive state, hCPEB3 forms part of neuronal granules which repress the translation of RNAs required for long term memory.

The main techniques used to understand the biological functions of this protein have been high resolution nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, as well as computational methods and biophysical techniques.

To understand the details of its function, the preferred conformations and dynamics of the N-terminal intrinsically disordered region have been determined by NMR spectroscopy. At 426 residues, this is second longest disordered region characterized to date. First, the region was completely assigned using a non-conventional strategy. Using conformational chemical shifts, ensembles of representative conformations were calculated for segments containing preferred structures.

After an initial analysis using bioinformatics tools, the phase transitions of hCPEB3 were characterized by biophysics and microscopy methods, both *in vitro* and in neuronal cells. Furthermore, studies probing the interaction of hCPEB3 with amyloid A $\beta$ <sub>42</sub>, the chaperone Hsp70 and the peptide polyglutamine inhibitor 1 (QBP1) providing insights into the interactions that modulate amyloid formation.

The results uncover interesting differences between functional and pathological amyloids; for example, proline residues act as gatekeepers in the former but are absent in the latter. All these findings have led to the proposal of an integrating model for regulated hCPEB3 amyloidogenesis which is in accord with the protein's role in



memory consolidation. The regulation of this process is sophisticated and involves the interaction of distinct elements which are rather distant along the sequence.

## ABREVIATURAS

<b><math>\alpha</math>APF</b>	anticuerpo anti-protofibrillas anulares (anti- <u>a</u> nnular <u>p</u> rotof <u>i</u> brils)
<b><math>\lambda_{\max}</math></b>	longitud de onda de máxima absorbancia
<b>Abs</b>	absorbancia
<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>ARN</b>	ácido ribonucleico
<b>ANS</b>	ácido 8-anilinaftalen-1-sulfónico
<b>ATP</b>	adenosín trifosfato ( <u>a</u> denosine <u>t</u> riphosphate)
<b>BMRB</b>	Banco de Datos de Resonancia Magnética Biológica ( <u>B</u> iological <u>M</u> agnetic <u>R</u> esonance <u>D</u> ata <u>B</u> ank)
<b>BF</b>	campo claro ( <u>b</u> right <u>f</u> ield)
<b>BSA</b>	albúmina de suero bovino ( <u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin)
<b>CC</b>	hélice superenrollada ( <u>c</u> oiled- <u>c</u> oil)
<b>CD</b>	dicroísmo circular ( <u>c</u> ircular <u>d</u> ichroism)
<b>COSY</b>	espectroscopía de correlaciones ( <u>c</u> orrelated <u>s</u> pectroscopy)
<b>CPEB3</b>	proteína elemento de unión de poliadenilación citoplasmática ( <u>c</u> ytoplasmic <u>p</u> olyadenylation <u>e</u> lement <u>b</u> inding 3)
<b>DMSO</b>	dimetilsulfóxido
<b>DSS</b>	ácido 4,4-dimetil-4-silapetan-1-sulfónico
<b>EGFP</b>	proteína fluorescente verde potenciada ( <u>e</u> nanced <u>f</u> luorescence <u>g</u> reen <u>p</u> rotein)
<b>ELA</b>	esclerosis lateral amiotrófica
<b>FBS</b>	suero fetal bovino ( <u>f</u> etal <u>b</u> ovine <u>s</u> erum)
<b>FL</b>	forma completa ( <u>f</u> ull- <u>l</u> ength)
<b>FRAP</b>	recuperación de fluorescencia tras fotoblanqueo ( <u>f</u> luorescence <u>r</u> ecovery <u>a</u> fter <u>p</u> hoto <u>b</u> leaching)
<b>FUS</b>	proteína fusionada en sarcoma ( <u>f</u> used in <u>s</u> arcoma)
<b>GdmCl</b>	cloruro de guanidinio ( <u>g</u> uanid <u>i</u> nium <u>c</u> hloride)
<b>HFIP</b>	1,1,1,3,3,3-hexafluoro-isopropanol
<b>Hsp70</b>	proteína de choque térmico de 70 kDa ( <u>70</u> -kDa <u>h</u> eat- <u>s</u> hock <u>p</u> rotein)
<b>HSQC</b>	espectroscopía de coherencia cuántica única heteronuclear ( <u>h</u> eteronuclear <u>s</u> ingle <u>q</u> uantum <u>c</u> oherence spectroscopy)
<b>IDR</b>	región intrínsecamente desordenada ( <u>i</u> ntrinsically <u>d</u> isordered <u>r</u> egion)
<b>IDP</b>	proteína intrínsecamente desordenada ( <u>i</u> ntrinsically <u>d</u> isordered <u>p</u> rotein)
<b>IPTG</b>	isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
<b>LB</b>	caldo de lisogenia (lysogeny <u>b</u> roth)
<b>LCR</b>	región de baja complejidad ( <u>l</u> ow- <u>c</u> omplexity <u>r</u> egion)

<b>LCST</b>	temperatura crítica inferior de disolución (lower critical <u>s</u> olution <u>t</u> emperature)
<b>LLPS</b>	separación de fases líquido-líquido (liquid-liquid <u>p</u> hase <u>s</u> eparation)
<b>LSPT</b>	transición de fases líquido-sólido (liquid-to- <u>s</u> olid <u>p</u> hase <u>t</u> ransition)
<b>MoRF</b>	elemento de reconocimiento molecular ( <u>m</u> olecular <u>r</u> ecognition <u>f</u> eature)
<b>NCC</b>	conversion conformacional nucleada ( <u>n</u> ucleated <u>c</u> onformational <u>c</u> onversion)
<b>NES</b>	señal de exportación nuclear ( <u>n</u> uclear <u>e</u> xport <u>s</u> ignal)
<b>NOE</b>	efecto Overhauser nuclear ( <u>n</u> uclear Overhauser <u>e</u> ffect)
<b>NOESY</b>	espectroscopía de efecto Overhauser nuclear ( <u>n</u> uclear Overhauser <u>e</u> ffect <u>s</u> pectroscopy)
<b>OD</b>	densidad óptica ( <u>o</u> ptical <u>d</u> ensity)
<b>PBS</b>	tampón fosfato salino (phosphate- <u>b</u> uffered <u>s</u> aline)
<b>PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa ( <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
<b>PPII</b>	poliprolina II
<b>ppm</b>	partes por millón
<b>PLD</b>	dominio de tipo prión ( <u>p</u> riion- <u>l</u> ike <u>d</u> omain)
<b>PTM</b>	modificación post-traducciona ( <u>p</u> ost- <u>t</u> ranslational <u>m</u> odification)
<b>QBP1</b>	péptido de unión a poliglutamina-1 ( <u>p</u> olyglutamine <u>b</u> inding <u>p</u> eptide <u>1</u> )
<b>RMSD</b>	desviación de la raíz cuadrática media ( <u>r</u> oot <u>m</u> ean <u>s</u> quared <u>d</u> eviation)
<b>ROI</b>	región de interés ( <u>r</u> egion <u>o</u> f <u>i</u> nterest)
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>RMN</b>	resonancia magnética nuclear
<b>RRM</b>	motivo de reconocimiento de ARN ( <u>R</u> NA- <u>r</u> ecognition <u>m</u> otif)
<b>SDS</b>	dodecilsulfato sódico ( <u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate)
<b>SEM</b>	error estándar de la media ( <u>s</u> tandard <u>e</u> rror of the <u>m</u> ean)
<b>TBS</b>	tampón TRIS salino ( <u>T</u> RIS- <u>b</u> uffer <u>s</u> aline)
<b>TDP-43</b>	proteína de unión a ADN con respuesta transactiva de 43 kDa ( <u>t</u> ransactive response <u>D</u> NA binding protein of <u>43</u> kDa)
<b>TEM</b>	microscopía electrónica de transmisión ( <u>t</u> ransmission <u>e</u> lectron <u>m</u> icroscopy)
<b>ThT</b>	tioflavina T ( <u>t</u> hioflavin <u>T</u> )
<b>TOCSY</b>	espectroscopía de correlación total ( <u>t</u> otal <u>c</u> orrelated <u>s</u> pectroscopy)
<b>UCST</b>	temperatura crítica superior de disolución ( <u>u</u> pper <u>c</u> ritical <u>s</u> olution <u>t</u> emperature)
<b>UV</b>	ultravioleta
<b>ZnF</b>	dedo de cinc ( <u>z</u> inc <u>f</u> inger)

## ÍNDICE GENERAL

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1. Las proteínas intrínsecamente desordenadas</b> .....	<b>4</b>
1.1.1. Clasificación y composición .....	4
1.1.2. Regiones de baja complejidad y dominios prionoides .....	9
<b>1.2. Orgánulos sin membrana: Un nuevo paradigma en biología</b> .....	<b>15</b>
1.2.1. Condensados biomoleculares dinámicos.....	18
1.2.2. Condensados biomoleculares no dinámicos.....	21
1.2.3. Amiloides funcionales .....	23
<b>1.3 La familia de proteínas CPEB</b> .....	<b>26</b>
1.3.1. Características estructurales de CPEB3 y sus homólogos.....	27
1.3.2. Mecanismo de regulación de la plasticidad sináptica .....	30
<b>1.4. Caracterización estructural y dinámica</b> .....	<b>33</b>
1.4.1. Utilización de métodos computacionales .....	34
1.4.2. Bases de la espectroscopía RMN.....	35
1.4.3. Fundamentos de microscopía y técnicas biofísicas.....	39
1.4.4. Consideraciones sobre los ensayos de separación de fases .....	42
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	<b>47</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>51</b>
<b>3.1. Herramientas bioinformáticas</b> .....	<b>51</b>
<b>3.2. Clonaje molecular</b> .....	<b>52</b>
<b>3.3. Expresión y purificación de proteínas</b> .....	<b>53</b>
3.3.1. Marcaje isotópico para el análisis por RMN.....	53
3.3.2. Preparación para los ensayos de LLPS.....	54
3.3.3. Purificación en condiciones nativas .....	55
<b>3.4. RMN en disolución</b> .....	<b>55</b>
3.4.1. Materiales e instrumentación .....	55
3.4.2. Asignación de los espectros 2D y 3D .....	56
3.4.3. Cálculo de las constantes de acoplamiento.....	58
3.4.4. Medida de las tasas de relajación.....	59
<b>3.5. Microscopía y técnicas biofísicas</b> .....	<b>59</b>

3.5.1. Identificación por TEM de especies amiloides .....	59
3.5.2. Ensayos de fluorescencia y cinética de fibrilación .....	60
3.5.3. Análisis por FRAP de los gránulos de hCPEB3.....	61
3.5.4. Determinación por CD de la estructura general.....	62
<b>3.6. Ensayos de citotoxicidad .....</b>	<b>63</b>
3.6.1. <i>Immunodot blot</i> .....	63
3.6.2. Determinación de la viabilidad y muerte celular .....	63
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>69</b>
<b>4.1. Estudio por RMN de hCPEB3.....</b>	<b>69</b>
4.1.1. Estructura general de la IDR.....	69
4.1.2. Elementos con estructura parcial.....	72
4.1.3. Repeticiones de glutamina.....	72
4.1.4. Repeticiones de prolina.....	78
4.1.5. Repeticiones de alanina-serina.....	80
4.1.6. Señal de exportación nuclear.....	87
<b>4.2. Separación y transición de fases de hCPEB3.....</b>	<b>89</b>
4.2.1. Análisis bioinformático de la secuencia .....	89
4.2.2. Propiedades estructurales <i>in vitro</i> .....	91
4.2.3. Bases moleculares de las separación y transición de fases.....	98
4.2.4. Estudio comparativo con los amiloides patológicos.....	105
4.2.5. Dinámica molecular en células neuronales.....	107
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>113</b>
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>129</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>133</b>
<b>VIII. ANEXO .....</b>	<b>157</b>
<b>8.1. Material suplementario .....</b>	<b>157</b>
<b>8.2. Índice de figuras y tablas .....</b>	<b>161</b>
<b>8.3. Publicaciones .....</b>	<b>163</b>

**Parte I**  
**INTRODUCCIÓN**

## **I. INTRODUCCIÓN**

---

Las proteínas son heteropolímeros no ramificados de 19 aminoácidos y el iminoácido prolina (aunque cuando se habla del conjunto se les denomina a todos ellos habitualmente como “aminoácidos”). Actualmente, la hipótesis más aceptada establece que estos polipéptidos se han originado como copolímeros constituidos al azar por estas 20 unidades estructurales que fueron seleccionados evolutivamente para adquirir y refinar sus diferentes propiedades químicas, estructurales y funcionales. Las interacciones hidrófobas, electrostáticas, de van der Waals y los enlaces de hidrógeno entre estos residuos y con el entorno delimitan la heterogeneidad físico-química de las secuencias de aminoácidos resultantes y juegan un papel clave en definir las propiedades estructurales de las proteínas.

Desde que en el año 1958 John C. Kendrew determinara la estructura de la mioglobina empleando cristalografía de rayos X (Kendrew, 1958), se estableció la idea de que las proteínas “útiles” o biológicamente activas adoptaban una estructura terciaria globular estable (Anfinsen, 1973). Esta visión imperante en el campo de la bioquímica durante la segunda mitad del siglo pasado hizo que, a pesar de su importancia, las proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPs) fueran ignoradas a causa de su propensión a la degradación proteolítica y su tendencia a la agregación inespecífica (Laurents and Mompean, 2017). A pesar de ello, Brian W. Pontius y Paul Berg establecieron en el año 1990 que la proteína hnRNPA1 era capaz de catalizar la renaturalización de las cadenas simples de ADN mediante una región aparentemente desordenada rica en residuos de glicina (Pontius and Berg, 1990).

En lo que va de este último siglo hemos asistido a cambios sustanciales en la percepción de la estructura y función de las proteínas que han dado lugar a un nuevo paradigma en las áreas de la biología molecular y celular, la bioquímica o la biofísica de las proteínas debido al descubrimiento de las funciones que las IDPs y sus regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs) desempeñan. Al mismo tiempo, el desarrollo de un gran número de métodos biocomputacionales y biofísicos de alta resolución, como la resonancia magnética nuclear (RMN) en disolución, ha permitido una mejor comprensión de las propiedades físico-químicas de esta clase de proteínas en relación a su función biológica en fisiología y en la aparición de enfermedades.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Las proteínas intrínsecamente desordenadas

Las IDPs son proteínas biológicamente activas que carecen de una única estructura tridimensional estable y existen como un conjunto de conformaciones extendidas, parcialmente plegadas y altamente dinámicas, codificadas por la secuencia de la proteína que se conoce como ensamble conformacional y que varía poblacionalmente con el tiempo (Turoverov et al., 2019). Las IDPs se encuentran en todos los proteomas y su abundancia típicamente aumenta con la complejidad de los organismos (Ward et al., 2004). En los organismos eucariotas, aproximadamente un tercio de las proteínas contienen al menos una zona intrínsecamente desordenada y la fracción del proteoma que las contiene es denominada “unfoldoma” (Dunker et al., 2000). Estas proteínas llevan a cabo habitualmente funciones relacionadas con el reconocimiento molecular y la regulación celular que dependen de interacciones moleculares reversibles y siguen mecanismos diferentes a los de las proteínas con estructura terciaria definida.

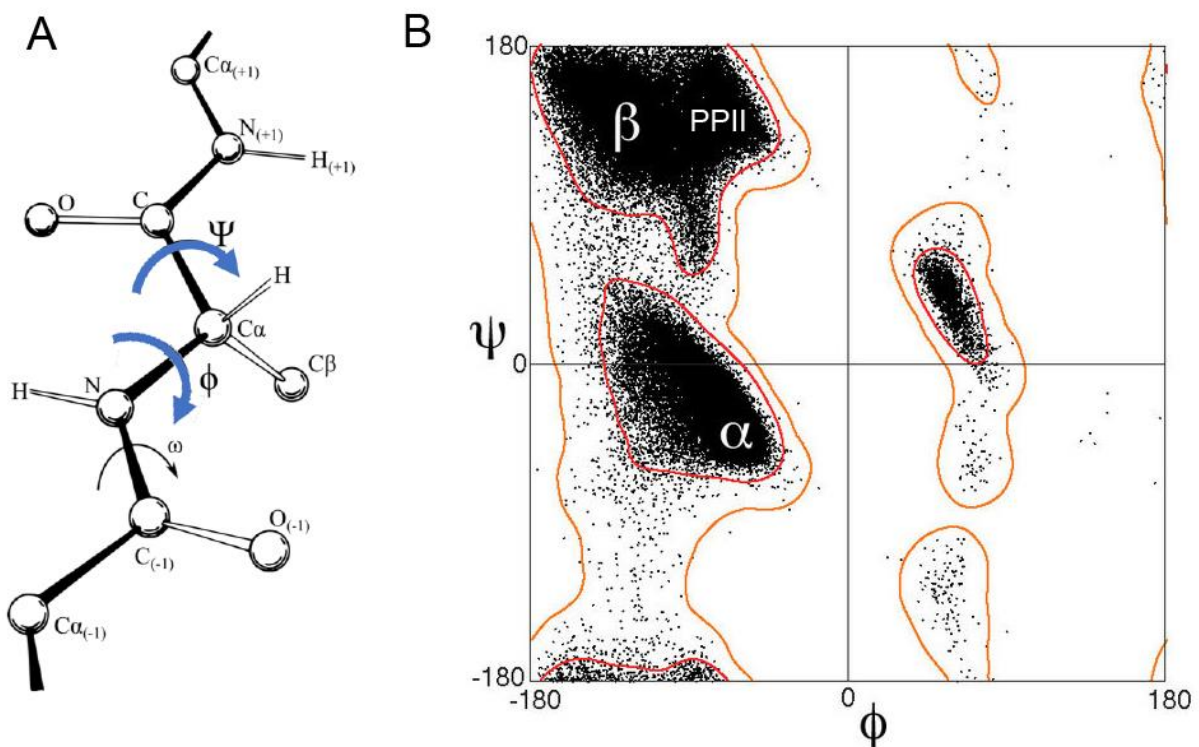
Mientras que en las proteínas plegadas la secuencia determina su estructura y función, en el caso de las IDPs la secuencia codifica el tipo de ensamblado y su mecanismo de acción, de modo que las propiedades funcionales y biofísicas de las IDPs se ven reflejadas en su composición, complejidad de secuencia y conservación. En este sentido, la falta de estructuras estables en las IDPs se debe a las propiedades particulares de las secuencias que las constituyen, como la presencia de residuos cargados no compensados o un bajo contenido de residuos hidrófobos. Diferentes regiones desordenadas y con estructura pueden trabajar conjuntamente para desempeñar su papel biológico y son significativamente frecuentes en proteínas de unión a ADN y ARN. Algunos ejemplos representativos de este tipo de proteínas son el represor Lac, el factor nuclear de las células T activadas o las proteínas p21, p27 y p57 (Oldfield et al., 2019).

#### 1.1.1. Clasificación y composición

En general, las cadenas polipeptídicas de las proteínas globulares pueden explorar un vasto número de conformaciones posibles, sin embargo, solo acceden a



un pequeño conjunto que constituye la estructura representativa para una proteína dada. Así, se ha determinado empíricamente que las proteínas plegadas solo pueden explorar regiones  $\phi$  y  $\psi$  concretas del diagrama de Ramachandran y cada enlace peptídico muestra una distribución en este diagrama con valores específicos (**Figura 1.1**) a diferencia de las IDPs que pueden ocupar todas las regiones permitidas. Por ello, estas proteínas son más dinámicas debido a las bajas barreras energéticas que separan los diferentes conformeros cuyas pequeñas fluctuaciones térmicas les permiten transitar entre los diferentes estados estructurales a los que pueden acceder.

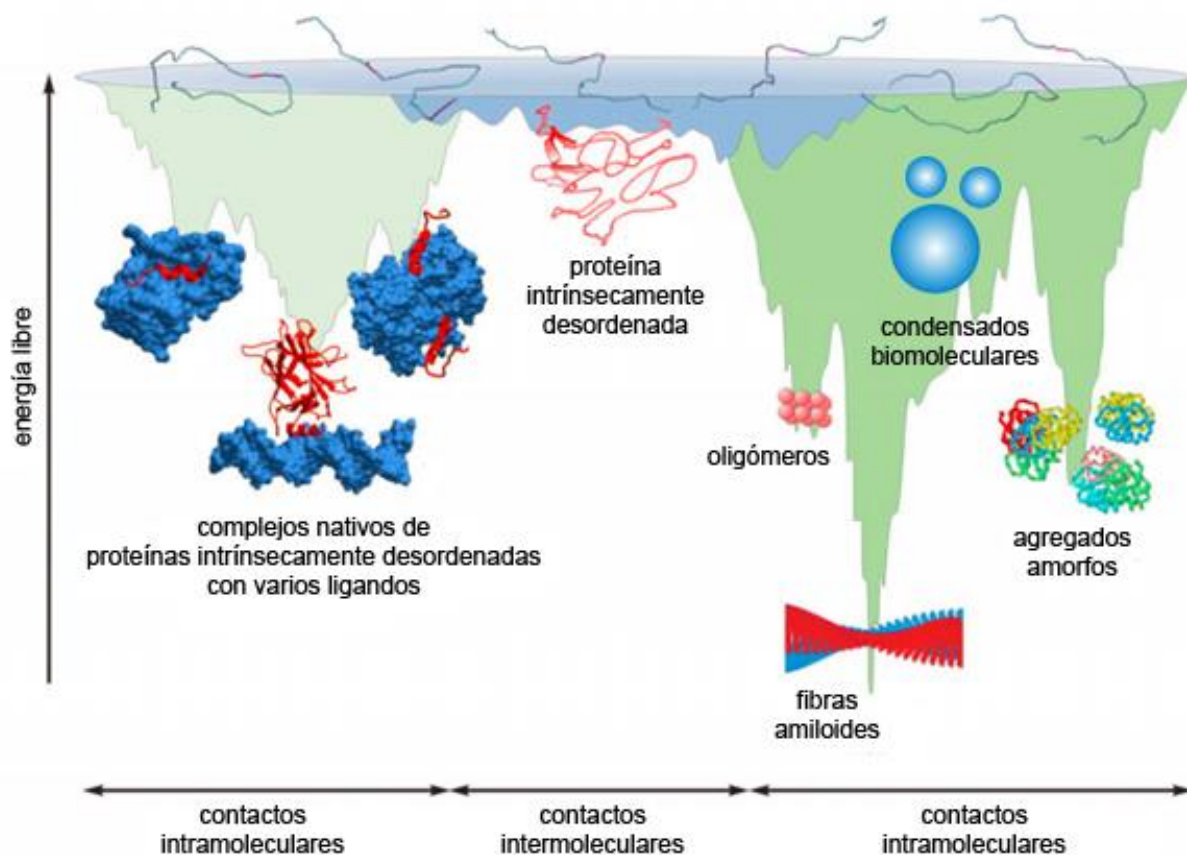


**Figura 1.1: Diagrama de Ramachandran. (A)** Nomenclatura de los átomos y de los ángulos diedros  $\phi$  y  $\psi$  de una cadena polipeptídica. **(B)** Diagrama de Ramachandran que muestra las regiones conformacionales permitidas (contorno en naranja) y favorecidas (contorno en rojo) para 97.368 residuos a partir de una base de datos que contiene la estructura en alta resolución de 500 proteínas <http://kinemage.biochem.duke.edu/>. Figura modificada de (Lovell et al., 2003).

Atendiendo a su grado de desorden por analogía con los intermedios que se forman durante el plegamiento de las proteínas globulares, las IDPs se encuentran en forma de ovillo estadístico, glóbulo profundido o glóbulo fundido (Uversky, 2003). Además, pueden estar formadas por una combinación de foldones, esto es, unidades

## I. INTRODUCCIÓN

plegables independientes de una proteína que no son equivalentes a un dominio. Así pues, las proteínas con un único dominio plegado pueden estar constituidas por diferentes foldones (Uversky, 2013). Se clasifican en foldones inducibles, regiones desordenadas que pueden plegarse al menos en parte debido a la interacción con ligandos; semifoldones, regiones que siempre se encuentran en un estado semiplegado; no foldones, regiones no plegables; y unfoldones, regiones que sufren una transición orden-desorden para ser funcionales, y su estructura y función están reguladas por modificaciones post-traduccionales, procesamiento alternativo de ARN e interacciones con otras proteínas (Uversky, 2019).



**Figura 1.2: Modelo del paisaje de energía libre de las IDPs.** A diferencia de las proteínas que presentan una estructura terciaria definida en medio acuoso, las IDPs no adoptan una conformación globular compacta. Tras la unión a ligandos específicos, determinadas zonas de una IDP o la proteína completa pueden adoptar una estructura plegada cuando la reducción de la energía libre es acompañada por la estabilización del complejo. Las IDPs también tienden a la formación de condensados biomoleculares, oligómeros y fibras de amiloide, así como agregados amorfos con mayor facilidad que las proteínas globulares a causa de su falta de estructura requerida para la formación de este tipo interacciones intermoleculares. Figura modificada de (Turoverov et al., 2010).

Las IDPs pueden experimentar una transición desorden-orden por unión a otros ligandos de forma permanente, como en el caso de las proteínas ribosomales que usan sus regiones intrínsecamente desordenadas para ocupar los espacios entre los bucles de ARNr o durante la formación de complejos a partir de protómeros intrínsecamente desordenados que adoptan una estructura plegada tras su unión (Wright and Dyson, 2009). Además, las IDPs tienen un papel fundamental en las vías de señalización de tipo interruptor y pueden plegarse transitoriamente para desempeñar su función mediante uniones específicas de baja afinidad (Iakoucheva et al., 2002). La plasticidad intrínseca de las IDPs también les permite adoptar diferentes estructuras según el ligando al que se unen (**Figura 1.2**). Así pues, los elementos de reconocimiento molecular, MoRFs, son pequeñas secuencias de las IDPs parcialmente estructuradas con tendencia a interactuar y plegarse cuando se unen a sus ligandos y se clasifican en función de la estructura que adoptan cuando están unidos (Vacic et al., 2007). Un subconjunto de este tipo de elementos son los *Morphing* MoRFs, capaces de adoptar diferentes estructuras según la naturaleza del ligando al que se unen (Uversky, 2016). Las IDPs también pueden permanecer predominantemente desordenadas tras unirse con sus ligandos (Fuxreiter, 2018). De este modo, la actividad de las denominadas “máquinas estocásticas” se debe enteramente a una conformación desplegada en forma de ovillo estadístico (Xue et al., 2013).

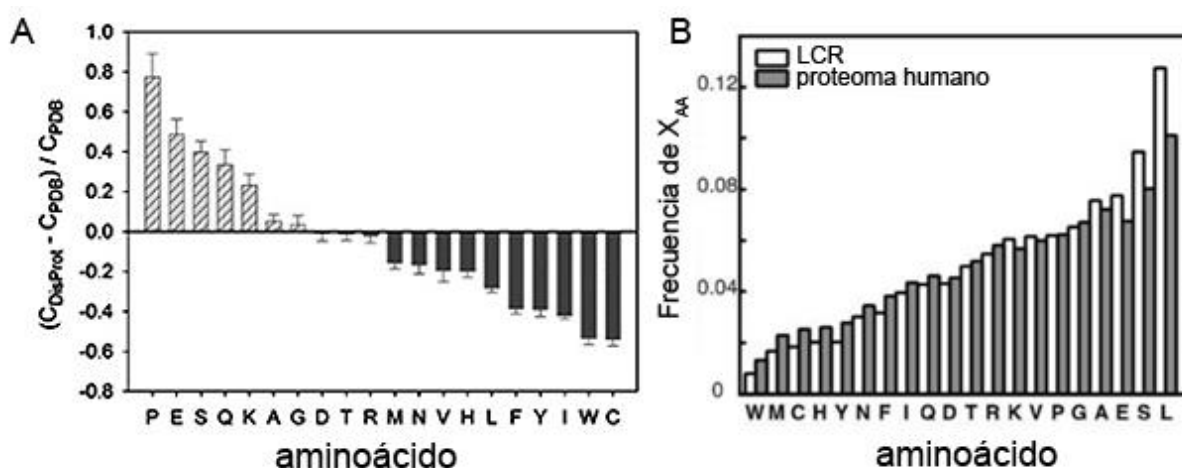
Una importante característica biofísica de algunas IDPs es su respuesta a los cambios en el entorno, pudiendo plegarse a causa de un aumento de temperatura o en condiciones extremas de pH, a diferencia de las proteínas que presentan una estructura globular. En este sentido es bidireccional, la función de las proteínas estructuradas también puede recaer sobre el desplegamiento local o global debido a cambios transitorios en un amplio espectro de factores ambientales como la temperatura, el pH, el potencial redox, la exposición lumínica, las fuerzas mecánicas o la interacción con ligandos (van Dam and Dansen, 2020; Giraldo, 2020; Jakob et al., 2014; Santos et al., 2020).

Así pues, la falta de una estructura fija en las IDPs, que poseen un amplio espectro de funciones biológicas debido a su heterogeneidad de secuencia y estructural, rompe con el paradigma estructura-función establecido hace más de un

## I. INTRODUCCIÓN

siglo y representado por el conocido modelo de llave-cerradura (Fischer, 1894). En este modelo la función específica de una proteína está determinada por su estructura tridimensional única que interacciona específicamente con su sustrato para ejercer un efecto químico. Sin embargo, estas proteínas representan una rica fuente de proteoformas que define el concepto de continuo estructura-función en el que una proteína dada existe como un conjunto de conformaciones dinámicas caracterizadas por su diversidad estructural y variada funcionalidad (**Figura 1.2**) (Uversky, 2015).

Las IDPs carecen de los residuos aminoacídicos que promueven el orden estructural (cisteína, triptófano, tirosina, fenilalanina, isoleucina, valina y asparagina) y en su lugar están enriquecidas en residuos que promueven el desorden (prolina, arginina, glicina, glutamina, serina, glutamato, lisina y alanina) (**Figura 1.3A**). En otras palabras, la composición de residuos de las IDPs es más simple que la de las proteínas y dominios con estructura tridimensional definida; sin embargo, esta simplicidad se traduce en un vasto paisaje conformacional asociado a su complejidad estructural. No obstante, secuencias de muy baja complejidad pero enriquecidas en residuos que promueven el orden, también pueden adoptar estructuras específicas y estables (De La Osa et al., 2007).



**Figura 1.3: Frecuencia de aminoácidos en las IDPs y las LCRs (A)** Diferencia fraccional en la composición de cada uno de los 20 tipos de aminoácidos entre IDPs y proteínas con estructura nativa donde  $C_{DisProt}$  es el contenido de un residuo aminoacídico dado en la base de datos *DisProt* y  $C_{PDB}$  es el contenido correspondiente en la base de datos *Protein Data Bank*. Figura modificada de (Uversky, 2019). **(B)** Correlación entre la frecuencia de los 20 tipos de aminoácidos en el conjunto de LCRs y en el proteoma de humano. Figura modificada de (Martin and Mittag, 2018).

Por otra parte, muchas de las secuencias de estas proteínas y dominios presentan una gran variabilidad siendo susceptibles a inserciones, deleciones y mutaciones puntuales debido a la falta de conservación evolutiva, propia de las secuencias de proteínas globulares que es requerida para adoptar una estructura estable (Brown et al., 2010; Daughdrill et al., 2005). Un ejemplo son las zonas N-terminal y C-terminal intrínsecamente desordenadas del supresor tumoral p53, que muestran poca conservación de secuencia excepto los dos motivos de unión a la ubiquitina ligasa Mdm2, donde la conservación es comparable a la de su dominio de unión a ADN (Lane et al., 2010). Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, las IDPs pueden ser entendidas como sistemas al borde del caos que operan en el límite entre el orden y la arbitrariedad en la región dónde la complejidad es máxima y se consideran principal fuente de evolución.

### **1.1.2. Regiones de baja complejidad y dominios prionoides**

Muchas IDPs también muestran una gran tendencia a ensamblarse formando complejos macromoleculares de mayor orden. De modo que la plasticidad estructural de este tipo de proteínas les permite establecer interacciones multivalentes intermoleculares y formar condensados biomoleculares y fibras de amiloide (**Figura 1.2**) (Aguzzi and Altmeyer, 2016). En este sentido, las IDPs pueden presentar regiones de baja complejidad (LCR), esto es, secuencias con un sesgo estadísticamente significativo por un reducido número de tipos de aminoácidos relativo a una distribución aleatoria (Martin and Mittag, 2018; Muiznieks et al., 2018).

A finales del siglo XX, una cuestión todavía sin resolver era si estas secuencias, que en el proteoma eucariota representan el 20% de todas las secuencias conocidas, eran funcionales o un artefacto evolutivo producto de la expansión y duplicación génica. Desde entonces, un número creciente de trabajos ha demostrado que este tipo de secuencias presentan propiedades bioquímicas y biofísicas específicas con actividad biológica (Mier et al., 2019). Un aspecto a destacar de las LCRs es su composición. Se ha observado que la frecuencia de cada uno de los 20 tipos de aminoácidos en todo el proteoma humano es similar cuando se compara con su frecuencia correspondiente en las secuencias de baja complejidad en su conjunto

## I. INTRODUCCIÓN

**(Figura 1.3B).** Además, aunque a menudo las IDPs presentan secuencias de limitada complejidad, las LCRs no necesariamente carecen de estructura. Así, diferentes estudios estadísticos y estructurales demuestran que más de la mitad de las proteínas conocidas tienen al menos una LCR y que las LCRs pueden adoptar una estructura secundaria con preferencia por la formación de hélices  $\alpha$  (Kumari et al., 2015). Cabe destacar que las repeticiones de un único tipo de aminoácido son los motivos más frecuentes encontrados en los proteomas de eucariotas y aproximadamente el 15% de sus proteínas las contiene (Jorda and Kajava, 2010).

En los últimos años se ha determinado la función de algunos de estos tipos de repeticiones (Chavali et al., 2020). Un ejemplo de ello son las repeticiones de 5 o más histidinas de las proteínas nucleares que constituyen las denominadas agrupaciones de gránulos intercromatínicos o las repeticiones de prolina que se unen a dominios SH3 presentes en una gran variedad de proteínas (Ren et al., 1993). Las repeticiones de glutamina y alanina son frecuentes en las proteínas de unión a ADN y en los factores de transcripción y parecen estar implicadas en interacciones proteína-proteína (Lavoie et al., 2003; Mier and Andrade-Navarro, 2020). No obstante, la expansión de estas repeticiones constituye la base molecular de al menos 19 enfermedades neurológicas, como la enfermedad de Huntington, y del desarrollo (Darling and Uversky, 2017). En el caso de la elastina, las repeticiones en tándem de prolina, glicina y valina son las responsables de las propiedades elastoméricas de esta proteína polimérica (Rauscher et al., 2006). Otros ejemplos son las repeticiones de fenilalanina y glicina de las nucleoporinas que participan en el transporte nuclear (Frey et al., 2006), o en las proteínas con repeticiones de serina y arginina que constituyen parte de la maquinaria de procesamiento del ARNm (Fu, 1995).

Por otra parte, los dominios tipo prión (PLDs) son un tipo de LCR rico en residuos aminoacídicos polares no cargados con tendencia a autoensamblarse en forma de amiloide **(Figura 1.2)**, una conformación autopropagable e insoluble organizada en fibras no ramificadas que adoptan una estructura de espina  $\beta$  cruzada, bien paralela o antiparalela, estabilizada por interacciones intermoleculares de las cadenas laterales y que se extiende en dirección ortogonal a la fibra dando lugar a un patrón de rayos X cruzado característico (Iadanza et al., 2018; Sipe and Cohen, 2000). Esta conformación presenta una gran estabilidad mecánica comparable a la del acero.

Casi cuatro décadas han pasado desde que el agente causal de la encefalopatía espongiforme transmisible fuera identificado como un prión. Se trataba de la primera proteína patogénica con un mecanismo biológico desconocido hasta el momento para la transmisión de información basado en la conformación estructural, que fue definida como infectiva por Stanley Prusiner, y causante del kuru y de la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (Prusiner, 1982). Un fenómeno similar fue observado por Reed Wickner unos años más tarde en levaduras que parecía estar basado en el reordenamiento estructural de la proteína Ure2, catalizado por una forma no nativa con diferentes fenotipos asociados, capaz de transmitirse de célula a célula de forma no mendeliana a la que definió como prión de levaduras debido al mecanismo de propagación y transmisión (Wickner, 1994). En este sentido, no todos los priones son tóxicos para las células y se considera que los priones de levaduras pueden conferir ventajas adaptativas a los individuos que los expresan en determinadas condiciones ambientales, si bien se asocian habitualmente con una pérdida de función de la proteína (Liebman and Chernoff, 2012). Actualmente se sabe que la propagación priónica en levaduras está mediada por la chaperona disgregasa Hsp104 a través de un mecanismo de fragmentación ausente en metazoos (Romanova and Chernoff, 2009), si bien los priones se encuentran en todos los seres vivos incluyendo bacterias (Harrison, 2019) y virus (Tetz and Tetz, 2018).

Uno de los priones más estudiados en *Saccharomyces cerevisiae* es la proteína Sup35 que, al igual que Ure3, posee un elevado número de residuos de glutamina y asparagina. Sin embargo, esta característica no es un requisito indispensable para la actividad priónica y la formación de amiloide de estas proteínas, como ocurre en el caso de la enzima Mod5, una ARNt isopentil transferasa conservada desde bacterias a humanos (Du, 2011; Suzuki and Tanaka, 2013). Además, se ha demostrado que tanto el intercambio de diferentes dominios priónicos (Kim et al., 2013) como el orden de sus residuos (Ross et al., 2005) no afecta a la actividad priónica de estas proteínas, lo que sugiere que la composición, y no la secuencia primaria, caracteriza la formación de los priones. Durante los últimos años, se han desarrollado diferentes métodos que permiten identificar nuevos priones basados en el contenido de residuos de glutamina y asparagina. Cabe destacar que fue en el año 2009 cuando Simon Alberti y sus colaboradores desarrollaron un modelo computacional oculto de Markov que permitió la identificación de proteínas de humano

## I. INTRODUCCIÓN

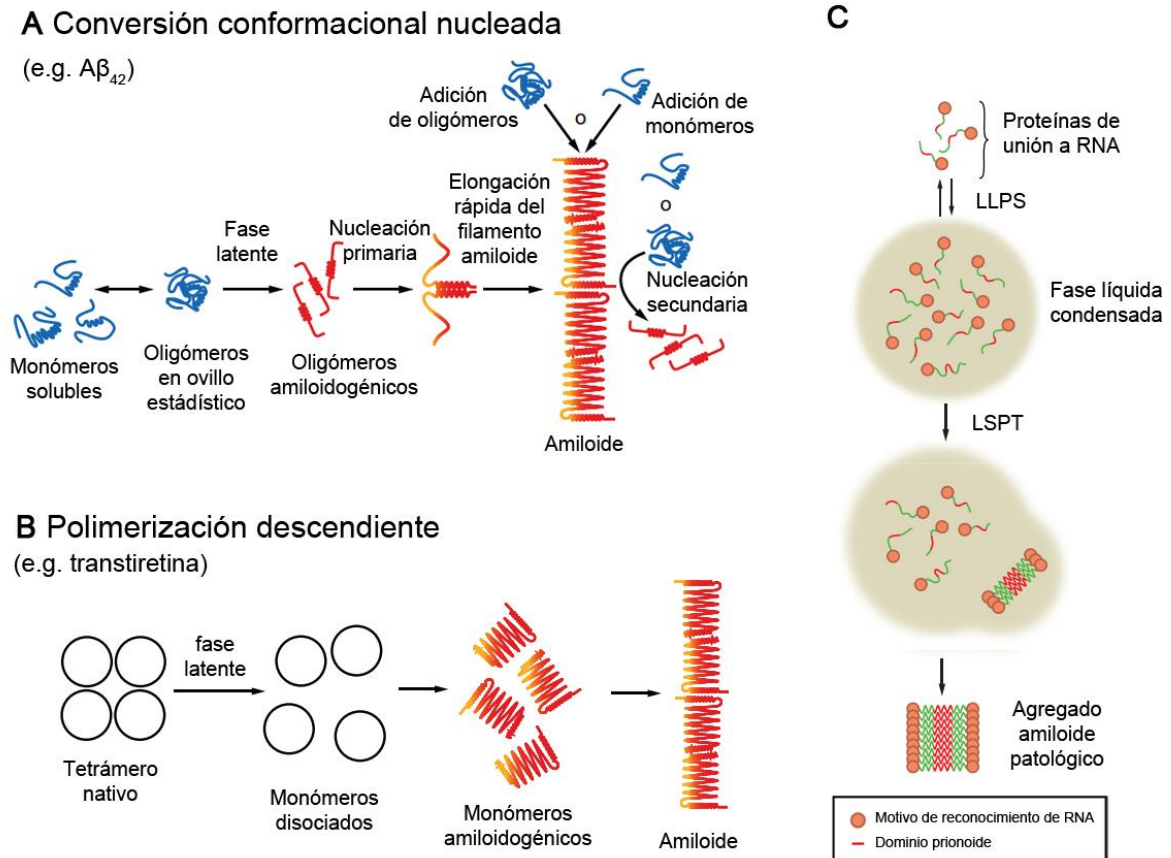
con regiones priónicas en sus secuencias (Alberti et al., 2009; Cascarina and Ross, 2014; Couthouisa et al., 2011).

Muchas enfermedades están relacionadas con el plegamiento aberrante de las proteínas y se conocen con el nombre de proteinopatías. Concretamente, aquellas producidas por priones o proteínas que contienen PLDs se caracterizan por su infectividad y transmisibilidad conformacional respectivamente, y en la mayoría de los casos cursan con demencia progresiva y neurodegeneración que afecta estructuras corticales, subcorticales, núcleos basales, tallo cerebral, médula espinal y sistema nervioso periférico. Además, cabe destacar que casi todos los casos de diabetes tipo 2 cursan con la acumulación de depósitos de amilina, un péptido cosecretado con la insulina que contribuye a la destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas (Zhang et al., 2014), y se asocia a un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer (Biessels et al., 2006). En particular, se ha propuesto que la nucleación cruzada, mecanismo cuyos fundamentos se han empezado a dilucidar tan solo en los últimos años, podría explicar la relación existente entre diferentes enfermedades asociadas con el plegamiento aberrante de proteínas (Moreno-Gonzalez et al., 2017; Ren et al., 2019). También se han encontrado formas amiloides de p53 que reducen su actividad supresora en determinados tipos de cáncer como el carcinoma de ovario (Ghosh et al., 2017).

Durante el siglo XX, se pensaba que solamente unas cuantas proteínas o péptidos tenían la particularidad de ser capaces de formar amiloide. Sin embargo, pronto se empezó a ver que esta idea no era del todo cierta cuando Marcus Fändrich, Matthew A. Fletcher y Christopher M. Dobson demostraron que la mioglobina, una proteína globular, es capaz de adoptar una estructura en forma de fibra amiloide (Fändrich et al., 2001). No obstante, los segmentos de las proteínas capaces de adoptar una estructura de amiloide, y que se conocen como cremalleras estéricas, suelen encontrarse en dominios plegados de las proteínas y no son capaces de agregar, a diferencia de los posicionados en regiones que son intrínsecamente desordenadas que sí demuestran una marcada tendencia a la formación de amiloide y ciertas mutaciones pueden exacerban su capacidad amiloidogénica intrínseca (Goldschmidt et al., 2010; Kim et al., 2013). Así pues, cabe destacar que cualquier proteína podría probablemente adoptar una estructura de amiloide bajo unas



condiciones determinadas. Por ello, es necesario que las células presenten diferentes mecanismos para mantener la proteostasis y prevenir la agregación bajo condiciones de estrés o proteólisis.



**Figura 1.4: Mecanismos de formación de amiloide. (A)** En el modelo de NCC, los monómeros parcial o completamente desplegados se encuentran en equilibrio con su forma oligomérica con estructura de ovillo estadístico que durante la fase de latencia adoptan una conformación de amiloide que da lugar a la formación de núcleos que finalmente desencadena la fibrilación amiloide. **(B)** Para la transtiretina, en la ruta de polimerización descendiente, la fase de latencia de la formación de amiloide está determinada por la cinética de disociación de los tetrámeros con estructura nativa a monómeros que rápidamente adoptan una conformación amiloidogénica. La fase de latencia de amiloides que siguen el mecanismo de polimerización descendiente durante su formación no se ve afectada por la presencia de núcleos preformados de amiloide. **(C)** La separación de fases en forma de condensados líquidos de IDPs con PLDs a través de interacciones multivalentes da lugar a la transición de fases a estado hidrogel y, finalmente, amiloide. Figura modificada de (Chuang et al., 2018).

En general, el modelo de ensamblado amiloide más aceptado propuesto por el equipo de Susan Lindquist en el año 2000 (Serio et al., 2000) para las IDPs se conoce como conversión conformacional nucleada (NCC) y explica con mayor precisión que los modelos previos la cinética sigmoidea y la dependencia de la amiloidogénesis de

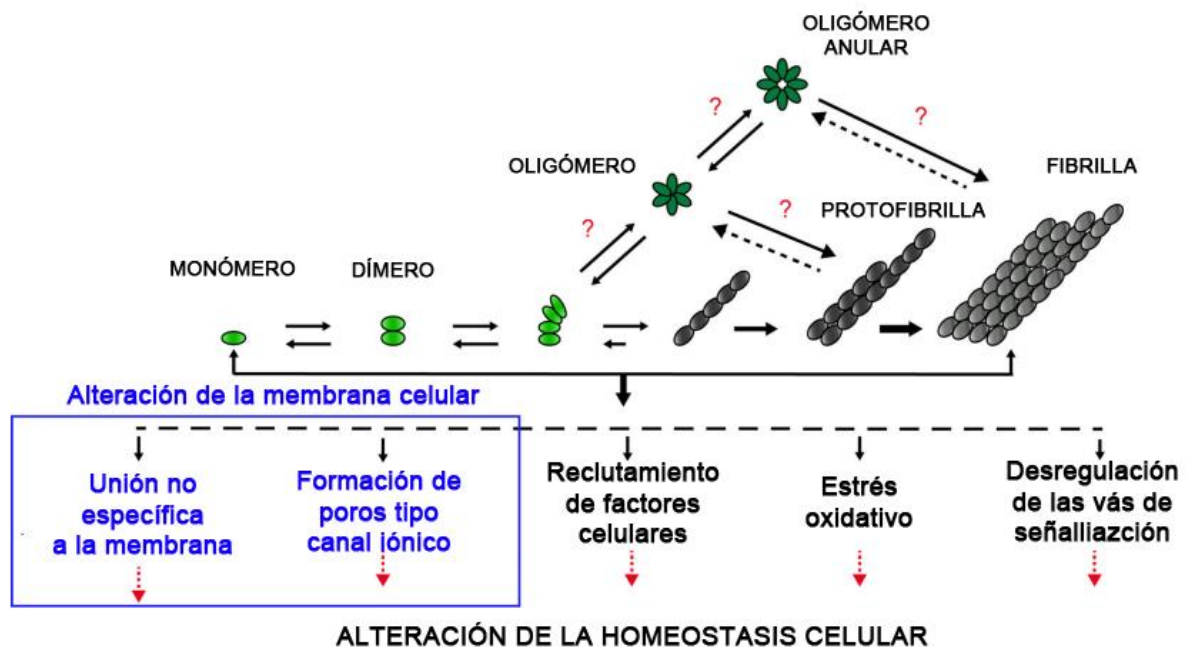
## I. INTRODUCCIÓN

la concentración de la proteína (**Figura 1.4A**). En el modelo de NCC los monómeros solubles están inicialmente en equilibrio con su forma oligomérica en ovillo estadístico que durante la fase de latencia se reordena para formar oligómeros amiloidogénicos que constituyen núcleos con estructura de espina  $\beta$  cruzada (Eisele et al., 2015). A continuación, la fibrilación ocurre rápidamente y nuevos monómeros adoptan la misma estructura uniéndose a los extremos de las protofibrillas que se elongan de esta forma. Por ello, la presencia de estas especies preformadas puede anular la fase de latencia actuando como molde de la conformación de amiloide y contribuyendo a la transmisión del fenotipo autorreplicativo codificado por el amiloide. Algunos ejemplos de IDPs que siguen el modelo de NCC son el péptido  $A\beta_{42}$  (Lee et al., 2011) o la amilina (Sun et al., 2019). Las proteínas con estructura terciaria como la transtiretina o la cadena ligera de las inmunoglobulinas, siguen un modelo de polimerización descendiente en el que la fase de latencia está caracterizada por la pérdida de la estructura nativa estable en monómeros que rápidamente adoptan una conformación de amiloide y por ello la transmisibilidad de este fenotipo es baja (**Figura 1.4B**) (Hurshman et al., 2004).

Curiosamente, los dominios prionoides aparecen frecuentemente en proteínas de unión a ADN y ARN como TDP-43 o FUS, cuya agregación está relacionada con el desarrollo de patologías como la ELA y la demencia frontotemporal (March et al., 2016). No obstante, existen identificadas al menos unas 240 proteínas de unión a ADN y ARN del proteoma humano que contienen PLDs, lo que sugiere que estos dominios pueden ser biológicamente activos y su función está en muchos casos todavía por determinar (Harrison and Shorter, 2017).

Diferentes estudios han propuesto modelos para explicar las bases de la citotoxicidad de amiloides como  $A\beta_{42}$  (**Figura 1.5**) (Williams and Serpell, 2011) o  $\alpha$ -sinucleína.(Fusco et al., 2017) A pesar de ello, los mecanismos de citotoxicidad que acompañan a la pérdida de función de estas proteínas todavía no se comprenden con el suficiente detalle. Si bien los primeros estudios señalaron a las fibras de amiloide como el agente neurotóxico que conduce a la muerte celular y la pérdida de memoria en la enfermedad de Alzheimer (Ross and Poirier, 2004), durante las dos últimas décadas un número creciente de trabajos sugiere que estas especies son biológicamente inertes a causa de su estabilidad termodinámica y que son los

oligómeros prefibrilares las especies que mayor daño celular producen (Benilova et al., 2012). Particularmente se ha demostrado que estos intermediarios de la amiloidogénesis son capaces de adoptar una estructura en forma de canal o poro con capacidad para permeabilizar las membranas celulares, pueden generar especies reactivas de oxígeno asociadas con estrés oxidativo y causar disfunción mitocondrial (Chen et al., 2015; Cheng et al., 2013; Kotler et al., 2014). Estas observaciones explicarían la poca correlación observada entre los depósitos de amiloide y el estado clínico de los pacientes (Terry et al., 1991). No obstante, trabajos recientes demuestran que las fibras de amiloide también deben considerarse especies relevantes en la progresión de la enfermedad capaces de mediar diferentes procesos patológicos (**Figura 1.5**) (Tipping et al., 2015).



**Figura 1.5: Hipótesis amiloide para la enfermedad de Alzheimer.** La cascada amiloidogénica suele ser heterogénea y actualmente no se encuentra completamente caracterizada. Diferentes trabajos identifican a los oligómeros anulares como la especie que produce mayor citotoxicidad. Una de las hipótesis más aceptadas sugiere que estas especies son capaces de producir alteraciones en la membrana perturbando la homeostasis celular. Figura modificada de (Kotler et al., 2014).

## 1.2. Orgánulos sin membrana: Un nuevo paradigma en biología

La compartimentalización celular ha sido reconocida durante décadas como un principio de organización fundamental para la vida. Por ello, uno de los problemas

## I. INTRODUCCIÓN

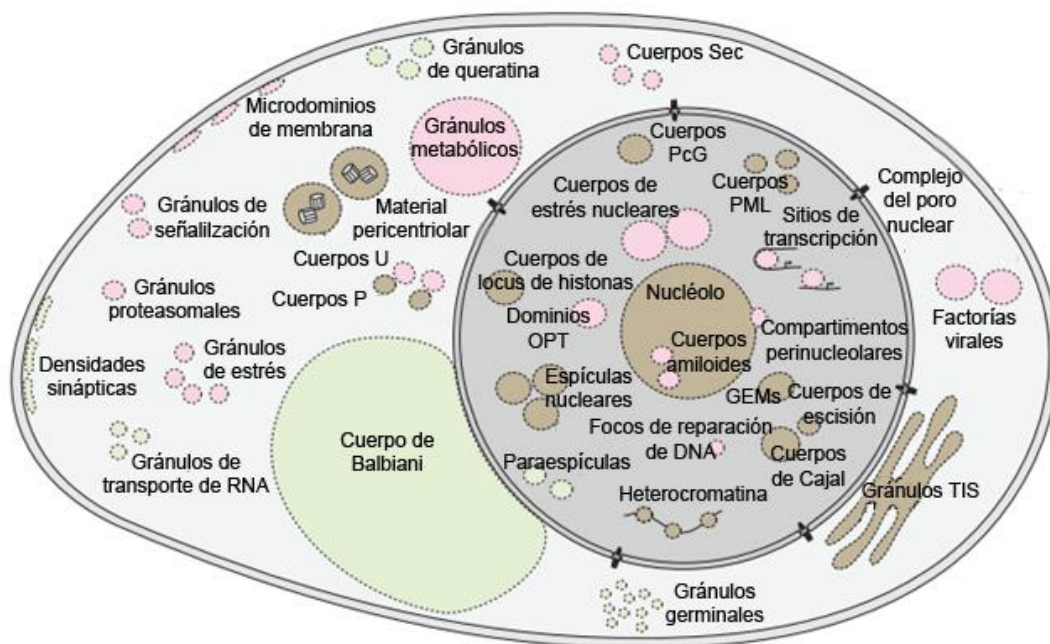
fundamentales de la biología celular es explicar cómo la organización espacial de las proteínas y ácidos nucleicos en las células mantiene controladas las reacciones bioquímicas esenciales para la vida. En los organismos eucariotas, los orgánulos celulares como el retículo endoplasmático o el aparato de Golgi son definidos clásicamente como compartimentos delimitados por una bicapa lipídica impermeable a la gran mayoría de moléculas y cuya composición está definida por la maquinaria de transporte específica que los regula. No obstante, muchos compartimentos celulares no están delimitados por membranas lipídicas (Banani et al., 2017).

Un tipo de estas estructuras son los complejos macromoleculares de estructura y estequiometría definidas como los ribosomas o el citoesqueleto. Otra clase incluye los que recientemente se han denominado como condensados biomoleculares; se trata de ensamblados macromoleculares que carecen de estructura estable con un tamaño de hasta varias micras de diámetro (Mitrea and Kriwacki, 2016; Woodruff et al., 2018). En la actualidad, se considera este tipo de compartimentos celulares como una fase líquida diferente del citoplasma (Hyman and Brangwynne, 2011). Dado que estos compartimentos carecen de una barrera física que separe sus componentes del medio que los rodea, el modo en que mantienen su estructura y regulan su composición y actividad bioquímica era hasta hace poco una incógnita.

A finales del siglo XIX, el biólogo Edmund B. Wilson describió por primera vez el citoplasma celular de los óvulos de la estrella de mar como densamente empaquetado por “coacervados” líquidos (Wilson, 1899), aunque el primer orgánulo sin membrana fue observado en el núcleo de células neuronales en la década 1830 (Wagner, 1835) al que más tarde sería llamado nucléolo (Pederson, 2011). Posteriormente, Alexander Oparin en los años 1920 propuso que estas estructuras representan el origen de la vida en la sopa primordial (Lazcano, 2016). A pesar de ello, estas ideas sobre estados citoplasmáticos de tipo líquido pronto fueron abandonadas en favor de la revolución que la biología celular sufrió durante las décadas de los años 60 y 70 con la cristalografía de rayos X y el estudio de interacciones estereoespecíficas entre proteínas con estructura definida. Ya durante los años 1990 se identificaron las balsas lipídicas como una fase de dos dimensiones diferente de las membranas celulares (Simons and Ikonen, 1997). Un descubrimiento precursor de los condensados biomoleculares en 3D que en el año 2009 Clifford P.

Brangwynne y sus colaboradores evidenciaron con la demostración de que los gránulos P germinales en *Caenorhabditis elegans* exhiben propiedades clásicas de los líquidos (Brangwynne et al., 2009).

Estudios más recientes han demostrado que otros ensamblados de ribonucleoproteínas, también llamados gránulos de ARN, como los cuerpos de procesamiento y los gránulos de estrés localizados en el citoplasma, o los cuerpos nucleares PML y los cuerpos de Cajal en el núcleo, pueden considerarse una fase en estado líquido diferente del citoplasma (Spannl et al., 2019). Igualmente, la heterocromatina, el canal de transporte del complejo del poro nuclear y las agrupaciones de moléculas de señalización en las membranas también pueden ser descritas con esta perspectiva (**Figura 1.6**).



**Figura 1.6: Ejemplos de condensados biomoleculares en la célula eucariota.** Resumen de la lista creciente de tipos de condensados biomoleculares presentes en las células eucariotas clasificados según su presencia en ubicuos (marrón), específicos de tejido (verde) y condicionales (rojo). Figura modificada de (Spannl et al., 2019).

Cada tipo de condensado biomolecular está constituido por diversos componentes moleculares, típicamente de 10 a varios cientos, que pueden intercambiarse con el medio que los rodea en escalas de tiempo en el rango de segundos a minutos y se dividen en dos clases. Las de tipo andamiaje son esenciales

## I. INTRODUCCIÓN

para la formación de la estructura, multivalentes y constituyen un pequeño subconjunto de sus componentes. La segunda clase de componentes llamados “clientes” está constituida por la mayoría de los componentes, presentan una baja valencia y son reclutados a la estructura por las proteínas de andamiaje a través de motivos de interacción específicos aunque en el caso de las IDPs estos dominios están menos definidos (Banani et al., 2017).

### **1.2.1. Condensados biomoleculares dinámicos**

El proceso físico de la separación de fases líquido-líquido (LLPS) de macromoléculas mediante el que se forman los condensados biomoleculares, ha surgido como un importante principio de organización celular esencialmente presente en todas las células eucariotas (**Figura 1.4C**). Es interesante mencionar que estas estructuras también han sido descritas en cloroplastos (Freeman Rosenzweig et al., 2017) y mitocondrias (Antonicka et al., 2013). Dado su origen endosimbiótico, existía la posibilidad de que la LLPS también ocurriese en procariontes. En este sentido, tan solo recientemente se ha evidenciado que este fenómeno también tiene lugar en bacterias sugiriendo que este mecanismo es un principio de organización universal en todos los seres vivos (Ladouceur et al., 2020). También se ha demostrado que las inclusiones citoplasmáticas de replicación y ensamblado de los virus pueden formarse mediante separación de fases y juegan un papel fundamental en la interacción huésped-patógeno (Alenquer et al., 2019; Heinrich et al., 2018).

La LLPS se observa macroscópicamente como la formación espontánea de gotas a partir de una solución miscible en respuesta a un cambio en sus condiciones ambientales como la temperatura, concentración, pH, fuerza iónica, presión osmótica o potencial redox. Este fenómeno se ha descrito para proteínas plegadas compuestas por dominios de interacción modular múltiple, IDPs y ácidos ribonucleicos. Por sus similitudes, el estudio de este fenómeno puede ser abordado desde el marco de la física de polímeros y de la materia blanda. (Banani et al., 2017).

Uno de los primeros ejemplos de dominios de interacción modular mejor caracterizados es el de la vía de señalización de regulación de la actina (Li et al.,

2012). El ensamblado entre los residuos de fosfotirosina de la proteína nefrina y el dominio de homología 2 de Scr de la proteína Nck, y entre su dominio SH3 y el motivo rico en residuos de prolina en la proteína N-WASP permite la separación de fases de esta agrupación de proteínas en la bicapa, que resulta necesario para el correcto ensamblado de la actina. Otro sistema análogo es el de las proteínas adaptadoras que participan en la activación de los linfocitos T. Además, la separación de fases se puede producir por la interacción multivalente de módulos plegados e IDRs, como en el caso de las proteínas de la densidad postsináptica (Zeng et al., 2016).

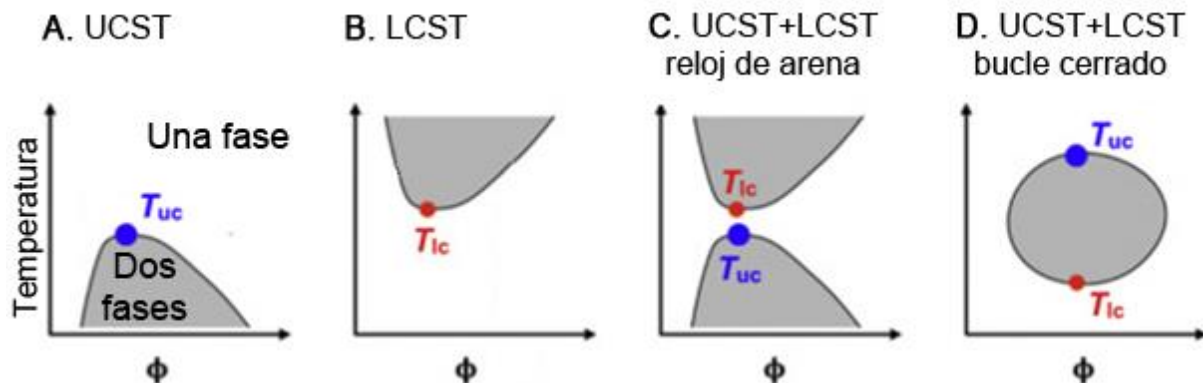
Por su parte, las IDPs con LCRs representan la segunda clase más abundante de macromoléculas que pueden separarse de fase *in vitro* en condiciones fisiológicas y son ricas en repeticiones de residuos de glicina, serina, glutamina, asparagina, fenilalanina y tirosina características de los dominios prionoides, así como repeticiones de residuos con carga positiva y/o negativa. Particularmente, varios estudios recientes han señalado la importancia de los residuos aromáticos como promotores de la LLPS a través de la formación de interacciones  $\pi$ - $\pi$  y catión- $\pi$ , además de las interacciones dipolo-dipolo y electrostáticas, que se establecen entre los residuos polares y con carga como ocurre para las proteínas FUS, EWS, hnRNPA1 y TAF15, o DDX4 respectivamente (Brangwynne et al., 2015; Wang et al., 2018b). La vida media de estas interacciones es corta y transitoria y refleja la naturaleza dinámica del estado líquido de las proteínas. Las interacciones hidrófobas también pueden mediar la separación de fases. Dos ejemplos hasta ahora estudiados de este tipo de fuerzas que también pueden gobernar la LLPS son la proteína extracelular elastina y la proteína Pab1.

Las IDPs pueden experimentar *in vitro* cuatro tipos de separación de fases en respuesta a cambios de la temperatura en función de su secuencia de aminoácidos (**Figura 1.7A**). Las LCRs de tipo polar o con carga presentan una temperatura crítica superior de disolución (UCST) por debajo de la cual se separan de fase (Ruff et al., 2018). Por su parte, las LCRs hidrófobas tienen una temperatura crítica inferior de disolución (LCST) por encima de la cual la LLPS ocurre (**Figura 1.7B**). A su vez, los sistemas con arquitectura de copolímero en bloque pueden estar formados por secuencias con una UCST alternadas con regiones que presentan también una LCST, dando lugar a dos tipos de diagramas de coexistencia, bien en forma de reloj de arena



## I. INTRODUCCIÓN

si el valor de la LCST es superior al de la UCST, o en forma de lazo cerrado si el valor de la LCST es inferior al de la UCST (**Figura 1.7C y 1.7D**) (Weitzhandler et al., 2017).



**Figura 1.7: Tipos de diagramas de separación de fases.** Curva de coexistencia para los sistemas con comportamiento (A) UCST y (B) LCST. (C) y (D) representan los dos tipos de curvas de coexistencia para sistemas con un comportamiento de tipo UCST y LCST. El área sombreada en gris denota un régimen de dos fases mientras que el área en blanco denota un régimen de una única fase.  $T_{uc}$  y  $T_{lc}$  representan las temperaturas crítica superior e inferior por debajo y por encima de las cuales la separación de fases tiene lugar, respectivamente.  $\Phi$  representa la fracción del volumen de la IDP. Figura modificada de (Ruff et al. 2018).

Se considera a estos cuerpos de proteína separados de fase como microrreactores donde aumenta la concentración local de macromoléculas con el fin de realizar funciones biológicas específicas como la aceleración de reacciones catalíticas, siempre y cuando enzima y sustrato se encuentren en la misma fase, y también confiere selectividad y especificidad a los procesos bioquímicos de forma similar a lo que ocurre en las vías de señalización. Uno de los ejemplos más sofisticados de esta organización funcional lo constituye el nucléolo donde coexisten diferentes subcompartimentos inmiscibles en fase líquida que regulan la síntesis de los ribosomas de forma específica (Feric et al., 2016). Pero el aumento de la concentración de macromoléculas en este tipo de condensadas no siempre resulta en un aumento de las cinéticas de reacción pudiendo ser inhibida su actividad, como ocurre en los gránulos de estrés y transporte de ARN (Alberti et al., 2019).

La LLPS también puede actuar a modo de sensor respondiendo adaptativamente a pequeños cambios en el medio, como por ejemplo de temperatura o pH. Particularmente, se ha demostrado recientemente que el dominio priónico de Sup35 regula la separación de fases de este factor de terminación de la traducción en condiciones de estrés, lo que sugiere que la conformación de amiloide



autorreplicativa de la proteína sería en realidad un epifenómeno de la LLPS (Franzmann et al., 2018).

También se debe aclarar que no todas las LCRs son capaces de separarse de fase. Así pues, secuencias con repeticiones ricas en residuos de leucina, como las de la proteína 4FCG, adoptan una estructura plegada de solenoide  $\alpha/\beta$  que no es capaz de pasar a estado líquido en condiciones fisiológicas. Otro ejemplo es la proteína anticongelante sfAFP de insecto, que adopta una estructura plegada a pesar de su baja complejidad, constituida por un 46% de residuos de glicina y un 14% de alanina (Treviño et al., 2018). Otros trabajos recientes han demostrado que las IDRs pueden presentar LCRs crípticas capaces de formar agregados de amiloide reversibles con funciones esenciales para la células (Pujols et al., 2018; Saad et al., 2017).

Las modificaciones post-traduccionales (PTMs) constituyen importantes reguladores de la separación de fases y de la dinámica de los condensados biomoleculares. Las PTMs alteran las propiedades físico-químicas de los residuos modificados; esto se traduce en un aumento o disminución de las interacciones multivalentes entre las macromoléculas que forman la fase separada y pueden causar tanto la retención y exclusión de macromoléculas específicas en los gránulos así como su completa formación y desensamblado (Gomes and Shorter, 2019). Concretamente, diferentes estudios recientes han demostrado la forma en la que PTMs como la fosforilación de los residuos de serina y tirosina (Monahan et al., 2017; Shorter, 2017; Wang et al., 2018a), la metilación de los residuos de arginina (Hofweber and Dormann, 2019; Qamar et al., 2018) o la sumoilación (Banani et al., 2016) son capaces de modular la LLPS. En esta línea, se ha demostrado que los sistemas de importación y exportación nuclear mediados por carioferinas constituyen otro mecanismo de regulación de la separación y transición de fases de proteínas nucleares como TDP-43 (Gasset-Rosa et al., 2019) o FUS (Guo et al., 2018).

### **1.2.2. Condensados biomoleculares no dinámicos**

En humanos, los PLDs contribuyen a la función de las proteínas de unión a ADN y ARN que los contienen permitiendo su LLPS. Este fenómeno favorece la

## I. INTRODUCCIÓN

tendencia de este tipo de proteínas a agregar de forma aberrante. Los primeros estudios analíticos sobre condensados biomoleculares comenzaron hace una década y se centraron en la influencia de los gránulos de estrés en la supervivencia celular y en su relación con el desarrollo de la ELA (Li et al., 2013; Molliex et al., 2015; Ramaswami et al., 2013). No obstante, la asociación entre las proteínas con PLDs y las enfermedades neurodegenerativas había comenzado casi dos décadas antes con la identificación de la expansión de la repetición del trinucleótido CAG en los genes que codifican las proteínas ataxina-1 (Banfi et al., 1994) y huntingtina (MacDonald et al., 1993) y que da lugar a una repetición de poliglutamina que causa la ataxia espinocerebelosa tipo 1 y la enfermedad de Huntington respectivamente. En el año 2006, TDP-43 se identificó como la primera proteína de unión a ARN implicada en neurodegeneración (Neumann et al., 2006) a la que pronto seguirían en los años posteriores las proteínas FUS, TAF15 y EWSR1 (Harrison and Shorter, 2017).

En la actualidad se sabe que las proteínas que forman los gránulos de estrés pueden agregar a través de un proceso de gelificación que se conoce como transición de fases líquido-sólido (LSPT) y su tendencia a experimentar este comportamiento parece estar relacionada con su composición (Aguzzi and Altmeyer, 2016; Wang et al., 2018b). En este sentido, la formación de hidrogel y fibras de amiloide se produce de forma similar a la NCC, pero en sentido macroscópico (**Figura 1.4C**). Por ello, muchos de los procesos patológicos asociados con las enfermedades neurodegenerativas son ahora revisados desde esta nueva perspectiva.

No obstante, las evidencias sugieren que este tipo de estado menos dinámico de los condensados biomoleculares ha sido adaptado por la evolución para el desempeño de diversas funciones celulares. Se ha demostrado que estas estructuras con propiedades viscoelásticas específicas son las encargadas de realizar procesos que requieren de trabajo mecánico como la endocitosis mediada por clatrina independiente de actina (Bergeron-Sandoval et al., 2017), la exocitosis de vesículas de sinapsina en la transmisión del impulso nervioso (Milovanovic et al., 2018) o la organización de la matriz extracelular (Muiznieks et al., 2018). La estructura porosa de estos condensados biomoleculares puede también selectivamente concentrar y excluir determinadas moléculas y por este motivo se consideran geles bioactivos dado que permiten su difusión específica. Un ejemplo lo constituye el material

pericentriolar de los centrosomas que durante la mitosis adopta un estado tipo gel que permite la concentración de tubulina y las proteínas estabilizadoras de microtúbulos (Woodruff et al., 2018). Otro ejemplo es el de los dominios FG del poro nuclear. A lo largo de las últimas décadas, diferentes modelos han intentado explicar cómo establecen una barrera selectiva entre el núcleo y el citoplasma. Así pues, los experimentos de fotoblanqueo han demostrado que forman una fase tipo gel siendo las proteínas que interaccionan con estos dominios capaces de atravesar el poro nuclear (Frey et al., 2006). En resumen, los condensados biomoleculares pueden adoptar diferentes estados, desde líquido viscoso a gel o amiloide funcional que se asocian con funciones específicas en las células (**Figura 1.6**).

### **1.2.3. Amiloides funcionales**

Actualmente existen aproximadamente, unas 50 proteínas o péptidos asociados a enfermedades en humanos que cursan con la acumulación de agregados de amiloide insolubles en células y órganos (Iadanza et al., 2018). Sorprendentemente, los amiloides también pueden realizar funciones en los seres vivos debido a sus propiedades únicas y es por ello que tienen especial interés para el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas (Díaz-Caballero et al., 2018).

Desde que en el año 2000 Han A. B. Wösten y Marcel L. de Vocht acuñaran el término amiloide funcional en un trabajo pionero sobre hidrofobinas en hongos (Wösten, 2001), se ha demostrado que estas estructuras también se encuentran en todos los seres vivos desde bacterias (Van Gerven et al., 2018; Giraldo, 2007) a humanos (**Tabla 1.1**). En estos últimos llevan a cabo procesos fisiológicos específicos como la síntesis de melanina (Fowler et al., 2005), la regulación de la plasticidad sináptica (Si et al., 2010), la selección espermática (Roan et al., 2017), la liberación de hormonas (Maji et al., 2009a) o la regulación de la muerte celular por necrosis (Mompeán et al., 2018). Los amiloides también pueden detener reacciones que tienen lugar en la célula. Importantes ejemplos incluyen los cuerpos de Balbiani (Boke et al., 2016) y los cuerpos amiloides (Audas et al., 2016), que promueven el estado latente del oocito y en condiciones de estrés respectivamente, y su formación es reversible (**Figura 1.5**).

# I. INTRODUCCIÓN

**Tabla 1.1: Listado de amiloides funcionales con evidencia experimental.**

ORGANISMO	AMILOIDE	FUNCIÓN	REFERENCIAS
<b>VIRUS</b>			
<i>Cytomegalovirus</i> <i>Herpes simplex</i>	M45 ICP6/ICP10	Inhibición de necroptosis, esencial para su propagación	(Muscolino et al., 2020; Pham et al., 2019)
<b>BACTERIAS</b>			
Arqueas metanógenas	MspA	Formación de la pared celular tubular y vesículas de gas	(Dueholm et al., 2015)
<i>E. coli</i> / <i>Pseudomonas</i> <i>Mycobacterium</i> <i>Streptococcus</i> <i>Bacillus</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Streptomyces</i>	CsgA/Fap MTP P1 TasA Bap/PSM Chaplinas/Rodlinas	Formación de biopelícula, adhesión e invasión celular. Factores de virulencia, activación de la respuesta inmunitaria	(Blanco et al., 2012; Van Gerven et al., 2018; Otzen and Riek, 2019; Zeng et al., 2015)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Microcina E492	Formación de esporas	(Bieler et al., 2005)
<i>Ustilago maydis</i>	Harpina	Proteína antibacteriana. Almacenamiento en estado inactivo en forma de amiloide	(Oh et al., 2007)
<i>Clostridium botulinum</i>	Rho	Desestabilización de membranas en plantas	(Yuan and Hochschild, 2017)
<i>Mycobacterium</i> <i>Bacillus Subtilis</i>	CarD HeiD	Helicasa conservada, regula la terminación de la traducción	(Kaur et al., 2018a, 2018b)
<i>Pseudomonas</i>	RepA	Mecanismo de control génico, regulador transcripcional	(Giraldo, 2020)
<b>HONGOS</b>			
Mohos	SC3	Replicación de ADN plásmidico	(Wösten, 2001)
<i>S. cerevisiae</i>	Cdc19	Hidrofobinas. Formación de esporas, crecimiento aéreo, adhesión	(Saad et al., 2017)
<i>S. cerevisiae</i>	Floculinas	Localización inactiva en los gránulos de estrés	(Chan et al., 2016)
<i>S. cerevisiae</i>	Ure2p Swi1p Mot3	Formación de agregados celulares durante la fermentación	(Alberti et al., 2009; Brachmann et al., 2005; Du et al., 2008)
<i>Candida albicans</i>	Als5p	Catabolismo del nitrógeno	(Chan and Lipke, 2014)
<i>Podospira anserina</i>	HET	Remodelación de la cromatina	(Riek and Saupe, 2016)
<b>ANIMALES</b>			
<i>Drosophila</i>	Imd	Regulador transcripcional	(Kleino et al., 2017)
Arañas	MaSp1/MaSp2	Regulación de la respuesta inmunitaria	(Kenney et al., 2002)
Peces y mamíferos	Acrosoma ZP	Seda de araña, protección, captura de alimento y refugio	(Guyonnet et al., 2014; Hewetson et al., 2017; Iconomidou et al., 2000)
Insectos y peces	Corion	Fecundación del oocito	
Mamíferos	SEM1/SEM2	Protección de la polispermia	
<i>X. laevis</i> , pez zebra y <i>Drosophila</i>	Xvelo, Bucky, Oskar	Protección del oocito	
Mamíferos	Fibrina	Eliminación de espermatozoides dañados	(Boke et al., 2016)
Mamíferos	Hormonas peptídicas	Formación del cuerpo de Balbiani	(Herczenik et al., 2007)
Mamíferos	LL-37/Protegrina-1 /CRES	Activador del plasminógeno	(Maji et al., 2009b)
Mamíferos	MBP	Señalización hormonal	(Jackson and Hewitt, 2017)
Mamíferos	Pmel17	Péptidos antimicrobianos	(Soragni et al., 2015)
Mamíferos	RIP1/RIP3	Almacenamiento inactivo en eosinófilos	(Fowler et al., 2005)
Mamíferos	ACM	Síntesis de melanina	(Mompeán et al., 2018)
<i>Aplysia</i> , <i>Drosophila</i> y mamíferos	ApCPEB, Orb2, CPEB3	Señalización de necroptosis	(Audas et al., 2016)
<b>PLANTAS</b>			
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Luminidependens FPA/FCA	Formación de los cuerpos A por estrés celular	(Kandel et al., 2014)
<i>Hevea brasiliensis</i>	REF	Regulación de la traducción del ARNm asociados a la plasticidad sináptica	(Antonets and Nizhnikov, 2017)
Algas verdes	EPS	Factor de elongación, biosíntesis de caucho	(Berthelot et al., 2012)
Tabaco	TGZ	Resistencia mecánica de la espina	(Mostaert et al., 2009)
<i>Raphanus sativus</i> <i>Cocos nucifera</i>	RsAFP-19 Cn-AMP2	Modificación postraduccional de proteínas, transglutaminasa	(Villar-Piqué et al., 2010)
		Péptidos antimicrobianos	(Garvey et al., 2013; Gour et al., 2016)

Dado el papel fundamental que juegan los amiloides en fisiología, así como su relevancia en neurodegeneración, la comprensión de la estructura de amiloide, los determinantes moleculares que rigen la amiloidogénesis y el modo en que las células consiguen controlar su citotoxicidad intrínseca a pesar de su producción, son algunos de los retos más importantes de la biología actual. Aunque los mecanismos concretos se desconocen, estudios recientes han señalado algunas vías mediante las cuales la toxicidad amiloide puede ser controlada. La regulación de los niveles de expresión de péptidos y proteínas amiloidogénicos, así como de su degradación o procesamiento proteolítico, la localización y el almacenamiento subcelular específicos (Jackson and Hewitt, 2017), una vida media de las especies tóxicas menor debida a tasas de fibrilación mucho más rápidas que las observadas para los amiloides patológicos (Hervás et al., 2016), su composición y estabilidad (Lu et al., 2020), o la capacidad para ensamblarse y desensamblarse debido a cambios en las condiciones del medio (Chuang et al., 2018), parecen ser algunos de los mecanismos que subyacen a la aparente inocuidad de los amiloides funcionales.

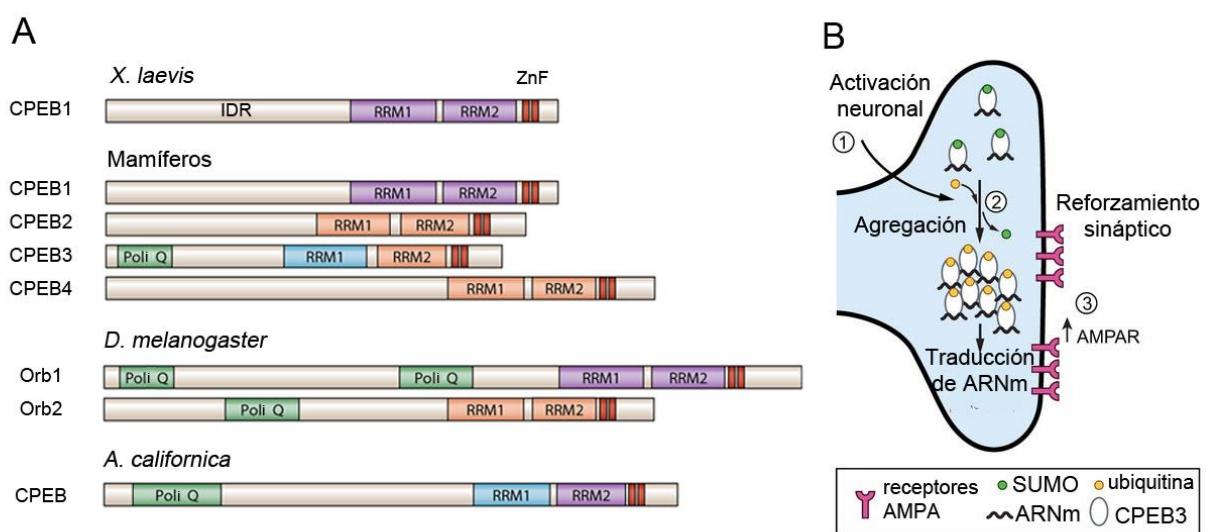
En este sentido, la autofagia y la vía ubiquitina-proteasoma son dos importantes mecanismos de degradación de amiloides tóxicos y especies oligoméricas (Chuang et al., 2018). Por su parte, las chaperonas moleculares y las disgregasas también son capaces de mantener la proteostasis celular. En concreto, las chaperonas Hsp70 y Hsp90 son capaces de unirse a regiones hidrófobas de las proteínas y asistir su plegamiento evitando su agregación patológica. Por ello, las chaperonas son importantes reguladores de la formación de amiloide, lo que les confiere un gran interés terapéutico como diana farmacológica (Abisambra et al., 2013; Lackie et al., 2017; Tsvetkov et al., 2020).

Por otra parte, a pesar de que la toxicidad de los amiloides produce daño celular en el contexto de las proteinopatías, la naturaleza también parece haber aprovechado esta característica de los amiloides para generar estructuras altamente citotóxicas (Torrent et al., 2011). Esto ocurre en el caso del péptido modulina secretado por la bacteria patogénica *Staphylococcus aureus* (Tayeb-Fligelman et al., 2017), la síntesis de péptidos y proteínas antimicrobianos durante la respuesta inmunitaria innata (Kagan et al., 2012; Soragni et al., 2015) o la proteína pqn-41 (Blum et al., 2013).

# I. INTRODUCCIÓN

## 1.3 La familia de proteínas CPEB

Originariamente descubierta en *Xenopus laevis* como activadora de la traducción del ARNm en estado latente durante la maduración del oocito (Hake and Richter, 1994), la familia de proteínas de unión al elemento de poliadenilación citoplasmática (CPEB) regula espacial y temporalmente la expresión del 20-30% de los genes en humanos (Belloc et al., 2008) y está compuesta por cuatro parálogos en vertebrados (Mendez and Richter, 2001; Richter, 2007). Todas las proteínas CPEB presentan una región N-terminal intrínsecamente desordenada y altamente variable tanto en longitud como en composición (Afroz et al., 2014), y dos motivos de unión a ARN (RRMs) y un motivo dedo de cinc (ZnF) que se unen al elemento de poliadenilación citoplasmática en la región 3' no traducida del ARNm regulando la traducción inducida por poliadenilación de forma no redundante (**Figura 1.8A**) (Giangarrà et al., 2015).



**Figura 1.8: Estructura de la familia de proteínas CPEB y su función neuronal. (A)** Representación esquemática que indica la relación estructural entre las proteínas CPEB de diferentes especies. Los RRM1 aparecen coloreados según su homología de secuencia. Las regiones ricas en residuos de glutamina aparecen coloreadas en verde. Figura modificada de (Ivshina et al., 2014). **(B)** (1) La activación neuronal de CPEB3 da lugar a (2) una forma agregativa de la proteína que favorece la traducción del ARNm que regula la plasticidad sináptica a través (3) del reforzamiento sináptico o potenciación sináptica a largo plazo. Figura modificada de (Chuang et al., 2018).

Por su parte, las proteínas CPEB2-4 constituyen una subfamilia que comparte un 95% de homología de secuencia de sus RRM1. Además, presentan un patrón de procesamiento alternativo similar e interactúan con un motivo del ARNm diferente

al que reconoce CPEB1 (Huang et al., 2006), a pesar de que ambos tipos regulan poblaciones de ARNm solapantes (Theis et al., 2003). En *Drosophila melanogaster* existe un solo miembro en cada grupo, Orb1 y Orb2 (**Figura 1.8A**). Se ha demostrado que las CPEBs pueden participar en la regulación de distintos procesos biológicos como la proliferación celular (Bestman and Cline, 2008; Novoa et al., 2010), el desarrollo embrionario (Prochazkova et al., 2018), el metabolismo (Alexandrov et al., 2012) y la senescencia (Groisman et al., 2006). Por el contrario, su mal funcionamiento se ha asociado con enfermedades como el autismo (Parras et al., 2018) y el cáncer (Fernández-Miranda and Méndez, 2012).

CPEB3, en concreto, regula la traducción de proteínas asociadas con el reforzamiento sináptico o potenciación a largo plazo que tiene lugar durante el aprendizaje y la consolidación de la memoria (Nicoll, 2017; Qu et al., 2020). Particularmente la expresión de la proteína de andamiaje PSD-95, los receptores de NMDA, las subunidades GluR1 y GluR2 de los receptores AMPA y la  $\beta$ -actina (**Figura 1.8B**) (Chao et al., 2013; Huang et al., 2006; Stephan et al., 2015). En este sentido, se entiende como plasticidad sináptica el proceso biológico por el que las neuronas modifican sus conexiones en redes discretas del cerebro y que se requiere para el establecimiento de la memoria a largo plazo que es dependiente de la síntesis proteica. De esta forma el cerebro humano tiene la capacidad de codificar, retener y subsecuentemente recordar experiencias y a la suma de lo que recordamos, consciente o inconscientemente, le denominamos memoria.

### **1.3.1. Características estructurales de CPEB3 y sus homólogos**

Las bases moleculares de la memoria a largo plazo, capaz de permanecer por décadas e incluso durante toda la vida humana a pesar del recambio constante de proteínas, ha fascinado durante mucho tiempo a neurólogos (Kandel, 2007) y a bioquímicos (Crick, 1984). Los primeros estudios realizados por Kausik Si, Susan Lindquist y Eric Kandel mostraron que los cambios a largo plazo que caracterizan la biología molecular de la plasticidad sináptica requieren una forma agregativa de CPEB en *Aplysia californica* (ApCPEB) (Si et al., 2003). Este cambio en la conformación que conduce a alteraciones permanentes a nivel sináptico es necesario

## I. INTRODUCCIÓN

para que la consolidación de la memoria tenga lugar y constituye uno de los procesos moleculares más importantes que subyacen a la memoria a largo plazo (Kandel, 2012).

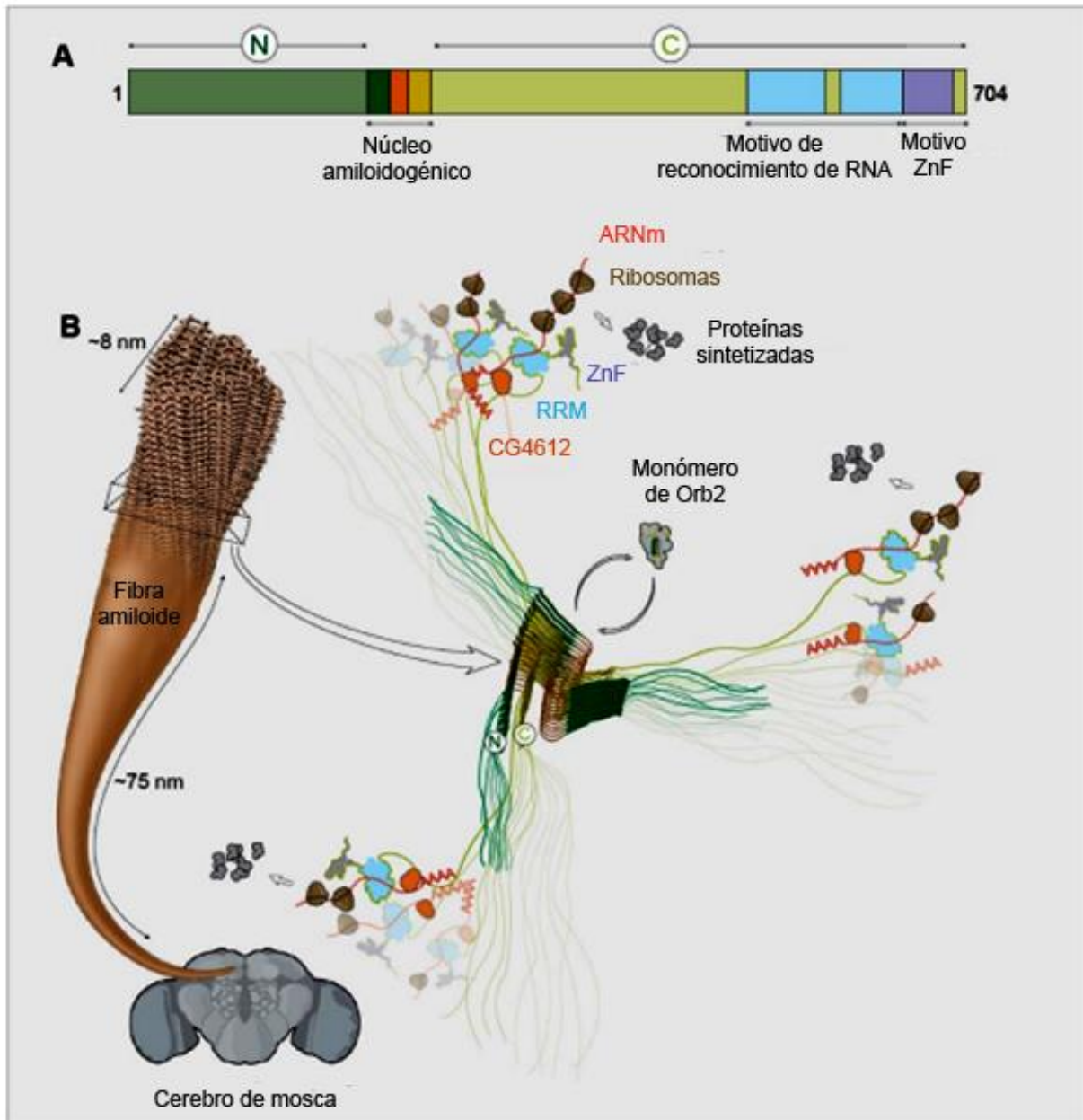
Estructuralmente, la IDR de *Ap*CPEB, contiene un gran número de repeticiones de glutamina que constituyen un PLD y su capacidad para activar la traducción depende de este dominio. Aunque la activación de CPEB está evolutivamente conservada, los mecanismos por los que el cambio conformacional ocurre son menos conocidos y se sabe que la región rica en residuos de glutamina, esencial para adoptar un estado autorreplicativo capaz de estabilizar la memoria, pierde su estructura en forma de hélice  $\alpha$  para adoptar una estructura de lámina  $\beta$  durante la formación del amiloide *in vitro* (Raveendra et al., 2013).

Por otra parte, ya se ha mencionado que la expansión de las repeticiones de glutamina en proteínas como la huntingtina (Jayaraman et al., 2012) o el receptor androgénico (Escobedo et al., 2019) está asociada con formas tóxicas de la proteína que agregan en enfermedades como la de Huntington o la atrofia muscular espinobulbar, respectivamente. A pesar de ello, se ha demostrado que la forma silvestre de la huntingtina participa en diferentes funciones neuronales como el transporte axonal o durante el proceso de la consolidación de la memoria en *Aplysia*, y su inhibición bloquea la facilitación a largo plazo, lo que sugiere una función en la regulación de la plasticidad sináptica (Choi et al., 2014). Curiosamente, las repeticiones de glutamina están ausentes en la huntingtina de *Aplysia* y *Drosophila* y parecen no ser requeridas para su función biológica.

Más recientemente, se ha demostrado que el homólogo de CPEB en *Drosophila* (Orb2) se comporta de manera similar a pesar de que su contenido de residuos de glutamina es menor y la formación del amiloide presenta una regulación más compleja (Khan et al., 2015; Majumdar et al., 2012). Orb2 tiene dos isoformas y ambas son requeridas para la memoria a largo plazo. Orb2A presenta un nivel de expresión bajo y es necesaria para la formación de amiloide de Orb2B actuando como cebador. Además, la inhibición de la formación de amiloide de Orb2B bloquea específicamente la consolidación de la memoria, pero no la memoria corto plazo (Hervás et al., 2016; Majumdar et al., 2012). Hace tan solo unos meses, la estructura



nativa del amiloide de Orb2B ha sido elucidada y se ha demostrado que el pH es capaz de regular la estabilidad de su estructura debido la presencia de residuos de histidina en el núcleo amiloidogénico (**Figura 1.9**) (Hervás et al., 2020a; Oroz et al., 2020).



**Figura 1.9: Modelo del amiloide de Orb2B y su función en la consolidación de la memoria. (A)** Representación esquemática de la organización de los dominios de Orb2B que indica la región formadora de la fibra de amiloide, los dos RRM y el motivo ZnF. **(B)** Representación de la formación de amiloide de Orb2B en la sinapsis. Orb2B en estado de monómero mantiene al ARNm que regula la plasticidad sináptica en un estado inactivo. Cuando se estimula la sinapsis, el PLD permite a la proteína alterar su conformación adoptando una estructura de amiloide activa que se une a la proteína CG4612 y recluta el complejo promotor de la traducción permitiendo a la sinapsis mantener su actividad incluso una vez el estímulo sináptico ha concluido. Figura modificada de (Hervás et al., 2020a).

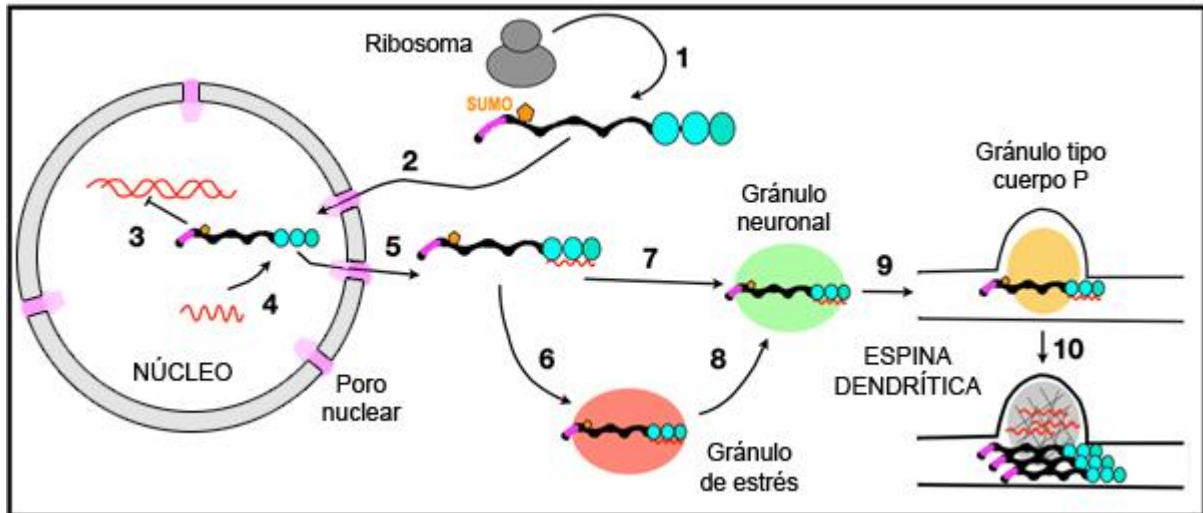
## I. INTRODUCCIÓN

En mamíferos, la región N-terminal de CPEB3 es considerada necesaria para la formación de amiloide y la consolidación de la memoria (Fioriti et al., 2015; Stephan et al., 2015). Comparado con *ApCPEB* y *Orb2*, el número de residuos de glutamina es menor y la regulación de la formación del amiloide funcional en CPEB3 parece incluso más sofisticada debido a la existencia de múltiples isoformas (Theis et al., 2003; Wang and Cooper, 2009), modificaciones post-traduccionales (Driscaldi et al., 2015) y bucles de retroalimentación que regulan los niveles de expresión de CPEB3 (Fiumara et al., 2015). No obstante, todos ellos conservan los dos RRM y el motivo ZnF, y presentan una IDR con un PLD similar al de otras proteínas como FUS o TDP-43. Por ello, la comparación de la formación de amiloide funcional de CPEB3 con estos amiloides patológicos resulta interesante y relevante para la comprensión en detalle de sus propiedades biofísicas.

### ***1.3.2. Mecanismo de regulación de la plasticidad sináptica***

CPEB3 se localiza en diferentes regiones neuronales donde realiza sus funciones (**Fig. 1.10**). Una vez sintetizada, a diferencia del mecanismo seguido por *Orb2* (Khan et al., 2015; White-Grindley et al., 2014), CPEB3 es sumoilada y se ha demostrado que esta PTM modula la agregación de CPEB3 inhibiéndola (Driscaldi et al., 2015). Cuando las neuronas son estimuladas, CPEB3, que es mayoritariamente citoplasmática, se trasloca al núcleo. Este proceso está mediado por la carioferina IPO5 a través de interacciones con la señal de importación nuclear del RRM1 de CPEB3 facilitando su translocación (Chao et al., 2012). Una vez dentro del núcleo, CPEB3 interacciona con el factor de transcripción STAT5B, que normalmente activa genes que codifican para proteínas relacionadas con la neurogénesis y la plasticidad sináptica, como el receptor de la tirosina quinasa, pero que en neuronas post-mitóticas están negativamente regulados por CPEB3 (Peng et al., 2010; Terlau and Seifert, 1990). Esta unión se produce entre la IDR de CPEB3 y los residuos 639-700 de STAT5B, pero las características de la interacción todavía no se conocen en detalle. Por otra parte, la resolución de la estructura tridimensional del RRM1 de CPEB3 humano (hCPEB3) ha demostrado que este dominio presenta una horquilla  $\beta$  adicional distinta al del RRM canónico que parece estar relacionada con la

especificidad de secuencia entre las dos subfamilias de CPEBs (Huang et al., 2006; Tsuda et al., 2014).



**Figura 1.10: Distribución celular de CPEB3.** La estimulación dendrítica de las neuronas desencadena la memoria a corto plazo mediada por fosforilación y (1) un aumento en la síntesis de la proteína CPEB3. (2) Si la estimulación neuronal persiste, CPEB3 se desplaza al núcleo y (3) regula la transcripción a través de STAT5B además de (4) unirse al ARNm que regula inhibiendo su traducción. Tras su salida del núcleo (5), CPEB3 y el ARNm pueden quedar retenidos en los gránulos de estrés en condiciones desfavorables (6). (7) En ausencia de factores de estrés o una vez han cesado, (8) CPEB3 unido al ARNm forma parte de los gránulos neuronales para ser transportado a través de las espinas dendríticas (9) y asociarse con otras proteínas para constituir los gránulos de tipo cuerpo de procesamiento. Una estimulación continuada causa (10) la desumoilación de CPEB3 y su agregación permitiendo la activación de la traducción del ARNm que media cambios en la morfología de la espina y su fortalecimiento, base de la memoria a largo plazo.

La salida del núcleo de CPEB3 unido al ARNm es facilitada por la carioferina CRM1 que reconoce la señal de exportación nuclear (NES) localizada entre los residuos 349-353. CPEB3 puede formar varios tipos diferentes de condensados biomoleculares localizándose en los gránulos de estrés en condiciones desfavorables, en los gránulos neuronales permitiendo su transporte a lo largo de las espinas dendríticas o en unos gránulos similares a los cuerpos de procesamiento que mantienen al ARNm en estado latente (Ford et al., 2019). Una estimulación neuronal persistente conduce a la desumoilación de CPEB3 y la conversión en su forma activa y agregativa mediada por la IDR que promueve la traducción del ARNm y regula la plasticidad sináptica de las neuronas en el hipocampo (**Figura 1.8B y 1.10**) (Driscaldi et al., 2015).

## I. INTRODUCCIÓN

Se ha descrito que otras PTMs como la metilación son capaces de regular la función de CPEB3, si bien su impacto estructural y función específica están menos caracterizados (Guo et al., 2014). Particularmente, se sabe que la ubiquitina ligasa Neuralized modula la actividad de CPEB3 facilitando la plasticidad neuronal y la consolidación de la memoria dependiente de hipocampo (Pavlopoulos et al., 2011). CPEB3 también puede ser fosforilada por actividad de la proteína quinasa A y la  $Ca^{2+}$ /calmodulina proteína quinasa II en neuronas hipocampales activas (Kaczmarczyk et al., 2016). Este tipo de modificaciones conducen a cambios estructurales en la sinapsis de forma específica que permiten que la consolidación de la memoria ocurra. Un ejemplo de ello es la remodelación del citoesqueleto de actina que tiene lugar a través de su interacción con CPEB3 y que refuerza la espina dendrítica aumentando permanentemente la neurotransmisión (**Figura 1.8B**) (Gu et al., 2020; Stephan et al., 2015).

La hipótesis de que la formación de amiloide funcional de CPEB3 es clave para la persistencia de la memoria (Si et al., 2003) se apoya en un gran número de experimentos *in vitro* así como en otros realizados en neuronas de los modelos animales de *Aplysia*, *Drosophila* y ratón revisados recientemente (Si and Kandel, 2016). La función de CPEB3 en la consolidación de la memoria ha sido corroborada por observaciones que sugieren que las personas que portan un alelo que codifica para una forma rara de CPEB3 y cuya expresión es baja, presentan un empeoramiento de la memoria episódica (Vogler et al., 2009).

La plasticidad sináptica también está regulada por CPEB1 y CPEB2. Por el contrario, se ha demostrado que ratones que no expresaban CPEB4 presentan una plasticidad sináptica y consolidación de la memoria aparentemente normales (Alarcon et al., 2004; Berger-Sweeney et al., 2006; Lu et al., 2017; Tsai et al., 2013). CPEB1 en *X. laevis* controla la morfogénesis dendrítica y forma gránulos neuronales que mantienen al ARNm en un estado latente y pueden encontrarse asociados a otras estructuras como los gránulos de estrés o los cuerpos de procesamiento (Bestman and Cline, 2008; Chae et al., 2010; Wilczynska et al., 2005). En este sentido, CPEB4 también es capaz de formar gránulos de ARNm inactivos mediante LLPS que son requeridos para la correcta progresión meiótica durante el ciclo celular (Guillén-Boixet et al., 2016; Parras et al., 2018). Estas observaciones reflejan cómo la dinámica

interacción entre diferentes estructuras citoplasmáticas granulares coordina la compartimentalización del metabolismo del ARNm.

Más allá del interés biológico fundamental que tiene comprender las bases moleculares de la memoria a largo plazo en humanos, estos descubrimientos permitirán el desarrollo de tratamientos para patologías como el trastorno de estrés posttraumático y otras enfermedades asociadas con el almacenamiento de lo que se denominan “memorias patológicas” como son consideradas las adiciones (Gisquet-Verrier and Le Dorze, 2019; Hopf, 2017; Hyman, 2005). Del mismo modo, la elucidación de los determinantes moleculares subyacentes a la separación de fases y la amiloidogénesis de hCPEB3 y los mecanismos celulares que regulan estas transiciones de fases evitando la toxicidad celular intrínseca que exhiben los amiloides, permitirá en un futuro identificar nuevas dianas terapéuticas para el desarrollo de estrategias que combatan las enfermedades neurodegenerativas asociadas con el plegamiento aberrante de las proteínas.

#### **1.4. Caracterización estructural y dinámica**

La habilidad de las IDPs para separarse de fase en ciertas condiciones parece ser una propiedad universal de forma similar a lo que ocurre con la formación de amiloide que constituye un estado general de las proteínas (Fändrich et al., 2001; Knowles et al., 2014). No obstante, del mismo modo que solo un subconjunto de proteínas es capaz de adoptar la conformación de amiloide en condiciones fisiológicas, solo algunas secuencias parecen tener la habilidad de separarse de fase en las condiciones que existen en las células vivas. A pesar de los grandes avances realizados en los últimos años en este campo de investigación, el conocimiento de los determinantes moleculares de la separación y transición de fases de las IDPs es todavía limitado. Por ello, la caracterización de sus propiedades estructurales y dinámicas es de gran importancia para poder racionalizar el papel biológico que desempeñan. En particular, los programas informáticos y las técnicas experimentales habituales, como la difracción de rayos X o la criomicroscopía electrónica, utilizadas para el estudio de las proteínas con estructura nativa no siempre son aplicables a las IDPs. Por ello, existen otros métodos computacionales para el estudio concreto de

## I. INTRODUCCIÓN

este tipo de proteínas que junto a técnicas biofísicas más específicas y la RMN en disolución son capaces de proporcionar información estructural y dinámica de alta resolución para su caracterización.

### **1.4.1. Utilización de métodos computacionales**

Los algoritmos usados clásicamente para determinar la estructura secundaria de las proteínas globulares no son útiles en el caso de las IDPs debido a las particularidades de sus secuencias. Por ello, se han desarrollado algoritmos específicos que permitan evaluar la tendencia al desorden de esta clase de proteínas. Estos métodos pueden ser predictivos o estar basados en información estructural experimental. Al primer grupo pertenecen más de 50 predictores (He et al., 2009) como el algoritmo IUPred (Dosztányi et al., 2005), que permite identificar las regiones desordenadas estimando la energía de interacción entre residuos necesaria para compensar el coste entrópico del plegamiento; FoldIndex (Prilusky et al., 2005), que emplea la hidrofobicidad media de sus aminoácidos y el valor absoluto de su carga neta y PONDR (Xue et al., 2010), un meta-predictor basado en las propiedades físico-químicas de los aminoácidos y en la composición. Para el cálculo de estructuras, el programa TALOS+ establece una relación empírica entre los desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  y  $^1\text{H}$  y los ángulos de torsión  $\phi$  y  $\psi$  de la cadena polipeptídica que determinan la estructura local (Shen et al., 2009). CYANA es un programa que puede generar un subconjunto de confórmeros que satisfacen los datos experimentales de los desplazamientos químicos, el efecto Overhauser nuclear y las restricciones angulares (Güntert and Buchner, 2015). Otros algoritmos incluidos en esta categoría son ENSEMBLE, TraDES y Flexible-Meccano.

De forma general, resulta muy útil identificar las regiones desordenadas en las proteínas para analizar sus propiedades físico-químicas y usar los resultados de estos análisis para generar hipótesis sobre las bases moleculares de la separación y transición de fases de las IDPs. En concreto, los algoritmos SEG y CAST (Kirmizoglou and Promponas, 2015) permiten identificar las LCRs de acuerdo con la complejidad de la secuencia o su composición respectivamente. El algoritmo PLAAC (Lancaster et al., 2014) es capaz de identificar dominios prionoides siguiendo un

modelo oculto de Markov basado en la composición de cuatro priones de *Saccharomyces cerevisiae* previamente identificados. Por su parte, el algoritmo catGRANULE evalúa la tendencia a la LLPS mediante el uso de predictores que mejor discriminan proteínas que forman gránulos del proteoma de *Saccharomyces* (Mitchell et al., 2013). AmyIPred 2 es una herramienta de meta-análisis muy útil que utiliza el consenso de hasta 11 métodos diferentes entre los que se encuentran los algoritmos AGGRESCAN, WATZ y TANGO desarrollados específicamente para predecir aspectos relacionados con la formación de fibras de amiloide (Tsolis et al., 2013). Otro algoritmo, ZipperDB, utiliza el método de perfil tridimensional basado en la estructura del péptido NNQQNY de la proteína priónica Sup35 formadora de amiloide. Así pues, los hexapéptidos de la secuencia cuya energía Rosetta está por debajo del valor umbral de -23 kcal/mol, empíricamente determinado, son considerados capaces de formar una estructura de dos láminas  $\beta$  cruzadas que constituye las fibras de amiloide (Thompson et al., 2006). A pesar de todos estos avances informáticos, las predicciones de secuencia deben corroborarse experimentalmente y su combinación constituye una estrategia fundamental para el entendimiento de la relación estructura-función de las IDPs y permite también el desarrollo de nuevos predictores más avanzados.

#### **1.4.2. Bases de la espectroscopía RMN**

La espectroscopía de RMN permite estudiar con detalle atómico la estructura de las macromoléculas biológicas como las IDPs en condiciones fisiológicas, a diferencia de la difracción de rayos X y la microscopía crioelectrónica que requieren de muestras en estado sólido. Los núcleos  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$  pueden actuar como sensores muy sensibles a cambios sutiles en el entorno químico como los conformacionales, permitiendo identificar los estados parcialmente plegados de una proteína. Si bien ha de tenerse en cuenta que el tamaño de la proteína y su solubilidad pueden suponer una limitación para su estudio por RMN (Gibbs et al., 2017; Murthy and Fawzi, 2020).

El espín es una propiedad fundamental de las partículas elementales por la que presentan un momento angular intrínseco de valor fijo. Los núcleos con espín,  $I$ ,

## I. INTRODUCCIÓN

distinto de cero se comportan como una distribución finita de carga y tienen un momento magnético proporcional y paralelo al espín nuclear y en presencia de un campo magnético se pueden encontrar en  $2I+1$  niveles de energía distintos. Por ello, para los núcleos  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$  cuyo espín tiene el valor de  $\frac{1}{2}$ , existen dos niveles de energía. Así pues, un protón en el nivel inferior puede absorber radiación electromagnética y pasar a un estado energético superior. Se dice que está en resonancia con el campo magnético, siendo la diferencia entre el nivel de menor energía  $\alpha$  y el de mayor energía  $\beta$  pequeña y directamente proporcional a la intensidad del campo externo. Cuando estos núcleos son irradiados con ondas electromagnéticas de la frecuencia adecuada, se induce un cambio en la orientación de los espines. Al volver a su estado inicial, estos espines emiten señales de radiofrecuencia que pueden ser detectadas. La señal obtenida se denomina decaimiento libre de la inducción y contiene todas las señales del espectro respecto al tiempo. Mediante una función matemática, conocida como transformada de Fourier, se obtiene un espectro con las señales en función de la frecuencia. Uno de los parámetros más importantes obtenidos es el desplazamiento químico que proporciona información sobre el entorno químico del núcleo de estudio. En proteínas, los valores de desplazamiento químico no sólo dependen del tipo de núcleo y su situación dentro del aminoácido, sino también del tipo de residuo, la conformación que adquiera dentro de la proteína, los residuos adyacentes y el medio (Gómez Moreno and Sancho, 2003; Santoro, 2018).

### ***1.4.2.1. RMN en disolución de péptidos y proteínas***

El alto grado de solapamiento de los espectros monodimensionales de las macromoléculas complica su análisis. No obstante, la asignación de las señales de péptidos de 10-30 residuos y proteínas de bajo peso molecular se puede realizar siguiendo la estrategia desarrollada por Kurt A. Wüthrich (Kumar et al., 1980) y no requiere del uso de marcaje isotópico. Los experimentos bidimensionales registrados siguiendo este método son la espectroscopía de correlaciones (COSY) y de correlación total (TOCSY) (Braunschweiler and Ernst, 1983), basados en la transferencia de magnetización a través de las constantes de acoplamiento escalares



entre protones que se correlacionan en el mismo sistema de espín, y la espectroscopía de efecto Overhauser nuclear (NOESY), que presenta cruce de picos fuera de la diagonal que se correlaciona con los protones que se encuentran próximos a causa de la transferencia entre dipolos de la magnetización a través del espacio y que se conoce como efecto Overhauser nuclear. Adicionalmente, para determinar los desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$ , la espectroscopía de coherencia cuántica única heteronuclear (HSQC) correlaciona enlaces  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  o  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  con la abundancia natural de  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$  (Bodenhausen and Ruben, 1980). En este caso, la magnetización se transfiere del protón al heteroátomo y vuelve al núcleo de partida. Sin embargo, a pesar de que la espectroscopía de RMN es probablemente la herramienta más poderosa de la que disponemos para la caracterización estructural de las IDPs, su asignación no es posible de forma general a través de la estrategia basada en los espectros 2D homonucleares debido a la poca dispersión de los desplazamientos químicos de los protones y a la superposición de señales.

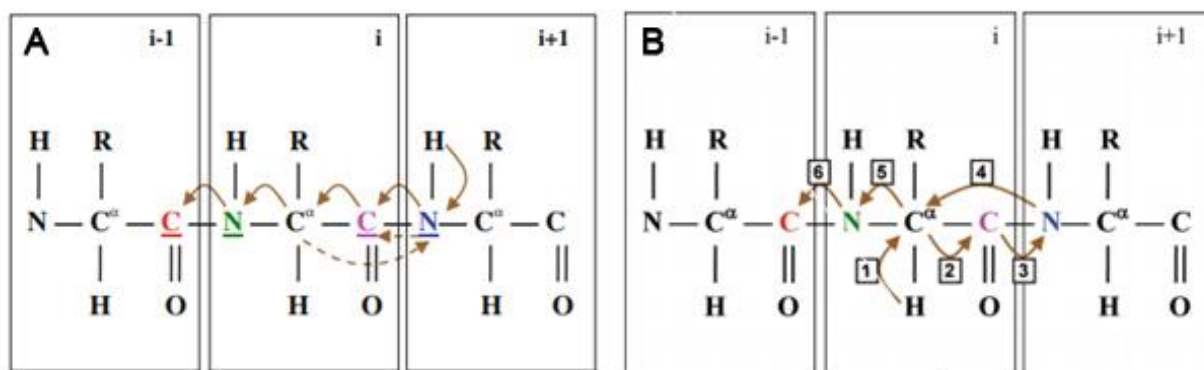
Para proteínas plegadas de 50-200 residuos, se utiliza una estrategia basada en la combinación de marcaje  $^{15}\text{N}$  y  $^{13}\text{C}$ , y los espectros 3D HNCO, HNcaCO, HNCA, HNcoCA, HNCACB y CBCAcoNH, que permite correlacionar los núcleos  $^{13}\text{C}'$ ,  $^{13}\text{C}\alpha$  y  $^{13}\text{C}\beta$  de residuos adyacentes. Sin embargo, para las IDPs esta estrategia de asignación presenta algunas limitaciones como la baja dispersión de los desplazamientos químicos de los protones amida y el ensanchamiento de sus señales, la ausencia de registros para los residuos de prolina que carecen de  $^1\text{HN}$  o la agrupación de las señales de  $^{13}\text{C}\alpha$  y  $^{13}\text{C}\beta$  en torno a valores característicos de la conformación de ovillo estadístico, que dificultan la utilización de estos métodos clásicos, así como la de otras estrategias alternativas que se han desarrollado en los últimos años y que siguen presentando este tipo de inconvenientes (Mäntylähti et al., 2011).

#### **1.4.2.2. Estrategia no convencional para la asignación de IDPs**

Con el objetivo de superar estas limitaciones se han desarrollado los experimentos hNcocaNCO y hnCOcaNCO que permiten correlacionar directamente dos grupos  $^{13}\text{C}'$ - $^{15}\text{N}$  aprovechando la buena dispersión entre ambos núcleos, si bien

## I. INTRODUCCIÓN

la interrupción de la conectividad que ocurre en los residuos de prolina y que suele aparecer frecuentemente representada en las secuencias de LCRs e IDPs, constituye una limitación debido a que la transferencia de la magnetización comienza en el protón amida (**Figura 1.10A**) (Pantoja-Uceda and Santoro, 2013). Afortunadamente, la asignación del esqueleto de hCPEB3, que tiene un elevado contenido de residuos de prolina consecutivos y que podría dificultar la asignación, puede realizarse utilizando un método innovador que combina la información de diferentes experimentos de RMN a través de los espectros tridimensionales hacacoNcaNCO y hacacONcaNCO (**Figura 10B**) (Pantoja-Uceda and Santoro, 2014).



**Figura 1.10: Experimentos para la asignación de IDPs (A)** Representación esquemática de la vía de transferencia de la magnetización implementada en el experimento HNCOCANCO. **(B)** Representación esquemática de la vía de transferencia de la magnetización implementada en el experimento hacacONcaNCO. Los núcleos aparecen coloreados para correlacionar los residuos  $i$  e  $i + 1$ . Las flechas indican el sentido de la transferencia de la magnetización.

Estas secuencias de pulso emplean el  $^1\text{H}\alpha$  en lugar del  $^1\text{HN}$  durante la excitación inicial y presentan dos ventajas principales. En primer lugar, se pueden registrar las señales correspondientes a los residuos de prolina, dado que se trata de un iminoácido que, aunque no presenta  $^1\text{HN}$ , sí tiene  $^1\text{H}\alpha$ . Además, se puede realizar en condiciones de pH elevado. Tradicionalmente la espectroscopía de RMN ha evitado trabajar a pH superior a 8 debido a que el intercambio de  $^1\text{HN}$  con  $^1\text{H}_2\text{O}$  ocurre rápidamente causando la pérdida de las señales. La mayor limitación de esta aproximación es que está basada en la detección del  $^{13}\text{C}$  en lugar de  $^1\text{H}$  y, por ello, la sensibilidad disminuye en un factor de 1:32, a lo que hay que añadir el elevado número de pasos de transferencia de magnetización utilizado entre núcleos. Así pues,

es esencial que la concentración de la muestra en disolución sea superior a 1 mM y se utilizan condiciones donde la solubilidad de la muestra se vea incrementada, como un tampón 1,0 mM ácido acético pH 4,0 en ausencia de sales, teniendo en cuenta que está algo alejado de las condiciones fisiológicas (Li et al., 2006). Por otra parte, es importante que el nivel de marcaje de  $^{15}\text{N}$  y  $^{13}\text{C}$  sea alto. Si tomamos por ejemplo que el nivel de marcaje fuese del 50%, en tres pasos solamente quedaría  $\frac{1}{2} \cdot \frac{1}{2} \cdot \frac{1}{2} = \frac{1}{8}$  o el 12,5% de la magnetización inicial. Además, es fundamental que la velocidad de relajación transversal  $R_2$  no sea muy elevada, si bien esto suele cumplirse de forma general para las IDPs. Por el contrario, los núcleos de los segmentos que adoptan parcialmente una estructura presentan mayor rigidez y tienden a manifestar señales más débiles.

#### **1.4.3. Fundamentos de microscopía y técnicas biofísicas**

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) utiliza un fino haz de electrones acelerados emitido por un filamento de wolframio o boruro de lantano como fuente de iluminación que atraviesan la muestra y produce su dispersión en diferentes trayectorias. La imagen de alta resolución que se forma es aumentada y proyectada sobre una pantalla fluorescente para su visualización en tiempo real, pudiendo registrarse mediante una película fotográfica o digitalmente para su estudio posterior. Adicionalmente, esta técnica puede complementarse mediante procedimientos de inmunomarcaje para obtener mayor detalle estructural y las imágenes obtenidas también pueden promediarse para realizar reconstrucciones tridimensionales (Williams and Carter, 2009). Por ello, la TEM es una técnica muy útil para la visualización de distintas especies amiloides y es un método esencial para su caracterización estructural *in vitro* a escala nanométrica que no puede abordarse por las técnicas de microscopía convencionales. Además, también permite identificar otras vías de plegamiento aberrante de las proteínas como la agregación amorfa. Así pues, esta técnica permite caracterizar la ruta de formación de amiloide de una forma relativamente fácil, rápida y precisa. Si bien no permite confirmar la estructura de espina  $\beta$  cruzada requiriendo para ello el uso de otras técnicas como la difracción por rayos X (Gras et al., 2011). En los últimos años, el desarrollo de la criomicroscopía

## I. INTRODUCCIÓN

electrónica y la espectroscopía RMN en estado sólido ha permitido finalmente abordar el estudio de la estructura atómica de las fibras de amiloide revolucionando el campo de la biología estructural (Iadanza et al., 2018).

La espectroscopía de fluorescencia es una herramienta experimental muy útil desarrollada en las últimas décadas que se basa en la emisión fluorescente de una muestra y que permite estudiar diferentes fenómenos biológicos. Generalmente, la emisión de luz ocurre en sistemas conjugados como las moléculas orgánicas en las que tiene lugar una transición electrónica entre orbitales moleculares  $\pi \rightarrow \pi^*$  y  $n \rightarrow \pi^*$ . Así pues, una vez que la molécula es excitada a un estado electrónico superior, puede liberar el exceso de energía emitiendo fotones para volver al estado fundamental. No obstante, existen otros mecanismos para esta pérdida de energía como la transferencia de carga intramolecular, cambios conformacionales, transferencia de energía al solvente y otras formas de decaimiento sin radiación que compiten con la fluorescencia (Jabłoński, 1933). Los dispositivos que miden la fluorescencia se denominan fluorímetros y su fuente de luz habitual es una lámpara de xenón que ofrece una intensidad relativamente uniforme para un rango espectral amplio. La disposición ortogonal del detector evita interferencias con la luz de excitación (Lakowicz, 2006). Algunas de las aplicaciones más comunes para el estudio de la estructura de proteínas utilizan moléculas fluorescentes que pueden clasificarse dependiendo de si forman parte constituyente o no del sistema de estudio. Ejemplos representativos del primer grupo son los residuos aromáticos de las proteínas como el triptófano, cuyo espectro de emisión varía en relación a su entorno químico y permite determinar el grado de exposición al solvente del grupo indol, la proteína fluorescente verde potenciada (EGFP) o el cofactor FAD+. Al segundo grupo pertenecen algunos de los fluoróforos más utilizados para el estudio de las propiedades estructurales de las IDPs como el ácido 8-anilinaftalen-1-sulfónico (ANS), empleado para evaluar la distribución de las zonas hidrófobas; y la tioflavina T (ThT), para identificar la presencia de conformeros con estructura de amiloide (Bagatolli, 2016).

El análisis por recuperación de fluorescencia tras fotoblanqueo (FRAP) mediante microscopía confocal es una técnica muy útil para determinar la dinámica molecular y la movilidad de los condensados separados de fase *in vitro* o bien en

células vivas y fue desarrollado originariamente para monitorizar la difusión lateral de sondas fluorescentes en la superficie de las membranas celulares. En estos experimentos, una región de interés se fotoblanquea produciéndose la destrucción química del fluoróforo. A continuación, se monitoriza la recuperación de la fluorescencia de la zona por difusión. Si los condensados presentan propiedades líquidas, la recuperación es rápida mientras que disminuye para los estados de gel y amiloide (Wang et al., 2019). A pesar de su extendido uso para estudiar las propiedades del estado líquido de las proteínas como por ejemplo su viscosidad, se deben tener en cuenta algunas consideraciones críticas al interpretar los resultados. Así pues, aunque en los experimentos de FRAP se asume que las proteínas fotoblanqueadas por el láser difunden y son reemplazadas por otras fluorescentes dando lugar a la recuperación de la señal fluorescente, la recuperación de la señal no se debe exclusivamente a la difusión libre de las moléculas en el condensado biomolecular ya que también se produce un intercambio con las proteínas en disolución en la célula. Además, existe una compleja dependencia con otros parámetros como el recambio de las proteínas, la asociación con otras macromoléculas, así como el número de éstas y su valencia. Por ello, cualquier cambio en estos parámetros puede influenciar la velocidad a la que se produce la recuperación de la fluorescencia (Mcswiggen et al., 2019).

El dicroísmo circular (CD) es una técnica basada en la interacción de la luz circularmente polarizada con átomos quirales y moléculas asimétricas que producen una desviación en el plano del haz. Los espectrofotómetros miden la diferencia en absorbancia entre los componentes de la luz polarizada y lo expresan en forma de elipticidad en grados. En la mayoría de estudios biológicos las señales de CD son muy pequeñas, del orden de 10 mdeg, correspondiente a una diferencia de absorbancia de  $3 \cdot 10^{-4}$  (Brahms and Brahms, 1980). En las proteínas, los cromóforos más importantes son el enlace peptídico, que absorbe por debajo de los 240 nm, las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos, que absorben en el rango de 260 nm a 320 nm, y los enlaces disulfuro, que aparecen como bandas débiles y anchas centradas en torno a 260 nm (Kelly et al., 2005). Los espectros de CD característicos en la región del ultravioleta (UV) lejano son altamente sensibles a la configuración del enlace peptídico en los diferentes tipos de estructura secundaria, como el ovillo estadístico, la hélice  $\alpha$ , el, el giro  $\beta$  de tipo I, la lámina  $\beta$ , la hélice  $3_1$  o la hélice

## I. INTRODUCCIÓN

poliprolina II (PPII), y permiten estudiar la conformación de IDPs en disolución (Chemes et al., 2012).

### **1.4.4. Consideraciones sobre los ensayos de separación de fases**

Los ensayos de separación de fases *in vitro* con proteínas recombinantes purificadas se han convertido en una forma estándar de investigar la capacidad de las proteínas para formar orgánulos celulares sin membrana. Hasta el momento, se ha demostrado que diferentes proteínas son capaces de separarse de fase y formar condensados líquidos *in vitro*, si bien cabe destacar que no en todos los casos estas observaciones se traducen en la formación de condensados biomoleculares en la célula con una función biológica asociada a la LLPS.

La expresión y purificación de proteínas que se separan de fase no está exenta de dificultades a causa de la presencia frecuente de PLDs que favorece su tendencia a la agregación complicando su estudio y caracterización. Además, estas proteínas son notablemente “pegajosas” y se unen a los materiales de los tubos y columnas de purificación. Debido a estas complicaciones, muchas estrategias comunes de purificación a menudo no funcionan. Por ello, se recomienda evitar el uso de columnas de purificación que requieran grandes volúmenes de lecho como la exclusión molecular o de intercambio iónico y utilizar tubos de baja unión para evitar la pérdida de proteína. Un problema común es que las proteínas que se separan de fase son marginalmente solubles en los tampones habituales, por ello se han evaluado diferentes condiciones para aumentar la solubilidad de las IDPs. También es importante considerar la concentración de las sales durante el proceso de purificación. Las proteínas globulares que no se separan de fase son típicamente solubles en tampones con altas concentraciones de sal a temperatura ambiente. Concretamente, se ha visto que altas concentraciones de sales y temperaturas por encima de 4 °C promueven la separación de fases de hCPEB3. Por ello, se recomienda usar tampones de baja fuerza iónica y trabajar en hielo cuando sea posible durante el proceso de purificación.

Sin embargo, este enfoque puede no ser útil para todo tipo de proteínas y depende de la composición específica de cada IDP. En este sentido, se debe

mencionar que existen muchos ejemplos en la bibliografía en los que las proteínas se describen como insolubles bajo condiciones de purificación estándar y que podría deberse a separaciones de fases que se consideran no deseadas. La separación de fases de las proteínas es muy sensible a su concentración, por ello se recomienda mantener este tipo de proteínas diluidas durante el proceso de purificación. Finalmente, se ha encontrado que los ciclos repetidos de congelación y descongelación disminuyen fuertemente la calidad de la proteína, por lo que se recomienda almacenar la proteína en pequeñas alícuotas que se utilicen una única vez y trabajar con proteína recién purificada para los ensayos de separación de fases en la medida de lo posible.

Como consecuencia de todos estos factores, los resultados de los ensayos de separación de fases pueden diferir entre laboratorios y no son fácilmente reproducibles. Por ello, existe una necesidad de producir proteínas de buena calidad, así como de procedimientos estándar y prácticas adecuadas para la realización de este tipo de ensayos. Esta tesis provee protocolos para la purificación y la realización de ensayos para estudiar la separación de fases *in vitro*. Se espera que este compendio de procedimientos y experimentos constituya una fuente de información útil para todos aquellos investigadores interesados en estudiar la separación de fases en las IDPs.

**Parte II**  
**OBJETIVOS**



## **II. OBJETIVOS**

---

El objetivo principal más inmediato de esta tesis es profundizar en la comprensión de la relación estructura-función de las proteínas prionoides utilizando como modelo el amiloide funcional humano CPEB3, regulador traduccional de la plasticidad sináptica y la consolidación de la memoria.

En cuanto a los objetivos generales, se espera que los resultados obtenidos puedan contribuir a una mejor comprensión de las bases moleculares que subyacen a la formación de la memoria a largo plazo que permita el desarrollo de tratamientos más específicos y eficaces para tratar ciertas patologías como el trastorno de estrés postraumático o las adicciones.

Por otra parte, el estudio comparativo con los amiloides patológicos podrá ayudar a la identificación de nuevas dianas terapéuticas basadas en las diferencias estructurales que caracterizan a esta clase de proteínas y favorecerá el desarrollo de nuevos fármacos para tratar diferentes proteinopatías actualmente mortales.

A continuación, se detallan los objetivos específicos de la misma:

- (1).** Aplicar una estrategia de RMN multidimensional que permita superar las limitaciones asociadas al estudio de IDPs y determinar la estructura y dinámica de la IDR de hCPEB3.
- (2).** Identificar las secuencias y los determinantes moleculares que dirigen la separación y la transición de fases de la IDR de hCPEB3.
- (3).** Caracterizar la naturaleza de las interacciones que promueven la condensación y la formación de amiloide de la IDR de hCPEB3 mediante el análisis por delección secuencial.
- (4).** Determinar los factores que regulan la amiloidogénesis funcional del PLD de hCPEB3 utilizando diferentes moduladores moleculares.
- (5).** Proponer un modelo basado en los resultados obtenidos que relacione la estructura de hCPEB3 con su función neuronal en la consolidación de la memoria.

**Parte III**  
**MATERIALES Y MÉTODOS**

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

---

#### **3.1. Herramientas bioinformáticas**

La conservación de las secuencias de la proteína CPEB3 en vertebrados fue determinada usando el programa T-coffee (Tommaso et al., 2011) y Clustal Omega (Sievers et al., 2011) usando la configuración predeterminada. Las secuencias elegidas como representativas de CPEB3 son: isoforma 1 de humano NP\_001171608.1, la isoforma 2 de humano, CA14105.1, isoforma 1 de ratón (*Mus musculus*) NP\_001277755.1, de gallo (*Gallus gallus*) XP\_105144323.1, de tortuga (*Chrysemys picta bellii*) XP\_005301348.1, de rana (*Xenopus tropicalis*) NP\_001015925.1 y de pez (*Danio rerio*) XP\_009305819.1.

El dominio PLD fue detectado mediante el algoritmo PLAAC (<http://plaac.wi.mit.edu/>) utilizando los ajustes predeterminados por defecto, el resto de dominios fueron identificados con el programa SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) o la herramienta de búsqueda de dominios conservados NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). La tendencia al desorden se calculó mediante el algoritmo IUPred (<http://iupred.enzim.hu/>). Para determinar la carga media de los aminoácidos de la secuencia se utilizó la herramienta EMBOSS Charge utilizando una ventana de 20 aminoácidos de longitud (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/charge>).

La plataforma web LCR-eXXXplorer se utilizó para identificar las LCRs mediante los algoritmos SEG y CAST (<http://repeat.biol.ucy.ac.cy/lcr-eXXXplorer>). Las secuencias amiloidogénicas se determinaron utilizando el programa AmylPred 2 estableciendo consenso si al menos cuatro de los diez algoritmos empleados identifican el residuo. El algoritmo SecStr fue excluido del análisis (<http://aias.biol.uoa.gr/AMYLPRED2/>). Estos resultados se compararon con los obtenidos por el algoritmo ZipperDB. Los hexapéptidos de la secuencia cuya energía Rosetta está por debajo del valor umbral de -23 kcal/mol empíricamente determinado se consideraron cremalleras estéricas (<https://services.mbi.ucla.edu/zipperdb/>). Para calcular la propensión a la formación de gránulos mediante LLPS se utilizó el algoritmo catGRANULE ([http://s.tartagliolab.com/update\\_submission/292534/ade](http://s.tartagliolab.com/update_submission/292534/ade)

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

5fba947). La tendencia a la formación de hélices superenrolladas se determinó con el algoritmo COILS que emplea como referencia una base de datos de secuencias conocidas ([https://embnet.vital-it.ch/software/COILS\\_form.html](https://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)).

#### 3.2. Clonaje molecular

El ARNm que codifica para hCPEB3 varía en longitud debido a la presencia de una ribozima, similar a la del virus delta de la hepatitis humana, en un intrón del gen que codifica para la proteína y que da lugar a la generación de diferentes isoformas cuya función exacta se desconoce (Salehi-Ashtiani et al., 2006). En este trabajo se ha estudiado la isoforma 2 de hCPEB3: Uniprot Q8NE35-2 / Genebank CA114105. Cabe destacar también que el pre-ARNm de Orb2A, la proteína homóloga en *D. melanogaster*, contiene un intrón con múltiples codones de stop que se salta solo cuando ciertos estímulos aptos desde el punto de vista del recuerdo son experimentados (Gill et al., 2017).

La IDR de la proteína CPEB3 que corresponde a los primeros 426 residuos de la proteína fue expresada en 8 segmentos de cien residuos altamente solapantes. De este modo, para controlar posibles efectos de borde, así como la reproducibilidad de los resultados, cada segmento solapa 50 residuos con el segmento anterior y el posterior (**Tabla 8.1.1**). Cada segmento fue clonado en un plásmido pET-28a(+) tras ser amplificado mediante PCR usando como molde un plásmido pLL3.7-Syn que contiene la secuencia de ADN que codifica para la forma completa (FL) de la proteína humana CPEB3-2, utilizando los cebadores y condiciones que aparecen en la **Tabla 8.1.2**. Los diferentes fragmentos de ADN amplificados fueron digeridos con las enzimas de restricción *NheI* y *XhoI* (*New England BioLabs*: Massachusetts, USA). El plásmido fue cedido amablemente por el Dr. Yi Shuiian Huang (Huang et al., 2014).

La expresión de los plásmidos resultantes dio lugar a las proteínas de fusión correspondientes con una etiqueta de polihistidina seguida de un sitio de corte para la proteasa TEV  $N_{1\alpha}$  de forma que cada segmento estudiado estaba precedido de la secuencia 1-MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASENLYFQ-29 en su extremo N-terminal. Adicionalmente a los segmentos solapantes de hCPEB3-2, cada una de las

regiones indicadas en la **Tabla 8.1.3** fue clonada en un plásmido pET-28a(+) siguiendo el mismo procedimiento.

### **3.3. Expresión y purificación de proteínas**

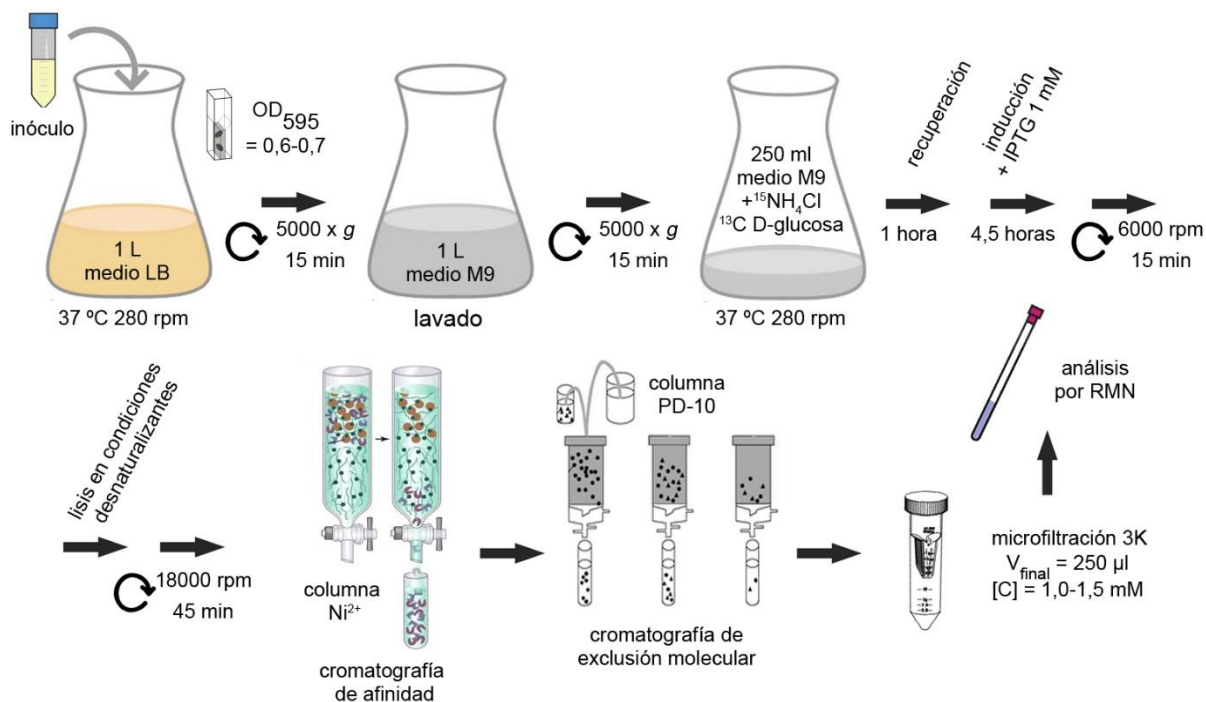
#### **3.3.1. Marcaje isotópico para el análisis por RMN**

Todos los segmentos fueron expresados en la cepa de *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) usando el sistema de expresión T7 (*Novagene*: Darmstadt, Alemania). El marcaje isotópico con  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$  de cada segmento se realizó usando un protocolo desarrollado previamente (Marley et al., 2001). En primer lugar, se creció un inóculo de células que contenía el plásmido de expresión para cada segmento en 1 L de LB a 37 °C con agitación a 280 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 595 nm ( $\text{OD}_{595}$ ) de 0,6-0,7. Seguidamente, las células se centrifugaron a 5.000 x *g* durante 15 minutos y se lavaron usando medio mínimo M9 (15,0 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 34,0 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 2,5 g/L NaCl para 1 L de sales M9 5x) que carece de las fuentes de nitrógeno y carbono. A continuación, las células se resuspendieron en 250 ml de medio mínimo M9 suplementado con  $^{13}\text{C}$  D-glucosa 4,0 g/L y  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  1,0 g/L (*Tracertec*: Madrid, España) y se incubaron durante 1 hora para permitir la recuperación del crecimiento y el aclaramiento de los metabolitos no marcados. La expresión de los segmentos recombinantes se indujo con IPTG (*Fermentas*: Maryland, EEUU) a una concentración final de 1 mM. Tras ser incubadas durante 4,5 horas, las células se recolectaron a 4 °C centrifugando a 6.000 rpm (rotor: F14-6x250y) (**Figura 3.1**).

La lisis del sedimento de células se realizó en condiciones desnaturalizantes con una disolución de 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 500 mM NaCl, 50 mM imidazol y 6 M GdmCl (*Panreac*: Illinois, EEUU) pH 7,4. Tras ser sonicados, los lisados se centrifugaron durante 45 minutos a 18.000 rpm (rotor: F21-8x50y) y los segmentos recombinantes de los clarificados se purificaron por cromatografía de afinidad en columnas de  $\text{Ni}^{2+}$  HisTrap HP de 5 ml (*GE Healthcare*: Chicago, EEUU) en un aparato HPLC ÄKTA Purifier (*GE Healthcare*) utilizando el tampón de elución 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 500 mM NaCl, 50 mM imidazol y 6 M GdmCl y monitorización por absorbancia UV a 280 nm. Finalmente, el exceso de sales fue eliminado por

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

cromatografía de filtración en gel usando una columna PD-10 (*GE Healthcare*) hasta 1 mM ácido acético deuterado pH 4,0 y los segmentos recombinantes fueron llevados a una concentración de 1,0-1,5 mM usando microfiltros Vivaspín (*Sartorius*: Goettingen, Alemania) en un volumen de 250  $\mu$ l que se dispusieron en tubos Shigemi de 5 mm para RMN de volumen reducido (**Figura 3.1**).



**Figura 3.1:** Representación esquemática del procedimiento para el marcaje isotópico con <sup>13</sup>C y <sup>15</sup>N. Resumen del protocolo seguido para el marcaje isotópico de los segmentos que constituyen la IDR de hCPEB3 y el método de purificación para su análisis por RMN.

#### 3.3.2. Preparación para los ensayos de LLPS

Todas las regiones y los segmentos de hCPEB3 fueron expresados en la cepa de *E. coli* BL21 Star (DE3) usando el sistema de expresión T7. Un inóculo de células que contenía el plásmido de expresión para cada segmento y región se creció en 1 L de LB a 37 °C con agitación a 280 rpm hasta alcanzar una OD<sub>595</sub> de 0,6-0,7. A continuación, se añadió a los cultivos IPTG a una concentración final de 1 mM y se incubaron durante 4 horas para inducir la expresión de las proteínas. Las células se recolectaron a 4 °C centrifugando a 6.000 rpm (rotor: F14-6x250y).

La lisis del sedimento de células se realizó en condiciones desnaturalizantes con una disolución de 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 50 mM imidazol y 6

M GdmCl pH 7,4 con agitación suave durante 30 min. Tras sonicarse, los lisados se centrifugaron durante 45 minutos a 18.000 rpm (rotor: F21-8x50y) y cada región y segmento recombinante se purificó por cromatografía de afinidad en columnas de Ni<sup>2+</sup> HisTrap HP de 5 ml en un aparato HPLC ÄKTA Purifier utilizando el tampón de elución 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 50 mM imidazol y 3 M GdmCl. Seguidamente, las proteínas recombinantes se diluyeron con PBS y 1 M GdmCl pH 7,4 hasta una concentración de ~ 5 µM, se dializaron con PBS y agitación suave a 4 °C durante 3 horas y finalmente se concentraron a 4 °C utilizando filtros Amicon Ultra (*Millipore*: Massachusetts, EEUU) centrifugando a 4.000 x g.

### **3.3.3. Purificación en condiciones nativas**

El plásmido pROEX que contiene la secuencia de ADN que codifica para la chaperona Hsp70 (cedido amablemente por José María Valpuesta) fue transformado en la cepa de expresión de *E. coli* C41 (DE3). La expresión de la Hsp70 y la FL de hCPEB3 fue inducida con IPTG a una concentración final de 1 mM incubando las células a 30 °C y con agitación a 280 rpm hasta el día siguiente. La lisis del sedimento tras recolectar las células se realizó en condiciones nativas con una disolución 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 50 mM imidazol, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100, 0,5% Tween 20, 1 mg/ml lisozima, 5 µg/ml ADNsa I y 5 µg/ml ARNasa A pH 7,4 (*Sigma-Aldrich*: Missouri, EEUU) que contenía un cóctel de inhibidores de proteasa Set III libre de EDTA (*Calbiochem*: San Diego, EEUU) y 1 mM PMSF (*Sigma-Aldrich*). La purificación se realizó mediante cromatografía de afinidad en columnas de Ni<sup>2+</sup> HisTrap HP de 5 ml en un aparato HPLC ÄKTA Purifier y el tampón de elución utilizado 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl y 500 mM imidazol pH 7,4.

## **3.4. RMN en disolución**

### **3.4.1. Materiales e instrumentación**

El D<sub>2</sub>O es un producto de *Euriso-top* (Saint-Aubin, Francia). El ácido acético deuterado se adquirió de *Sigma-Aldrich*. El ácido DSS utilizado como referencia

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

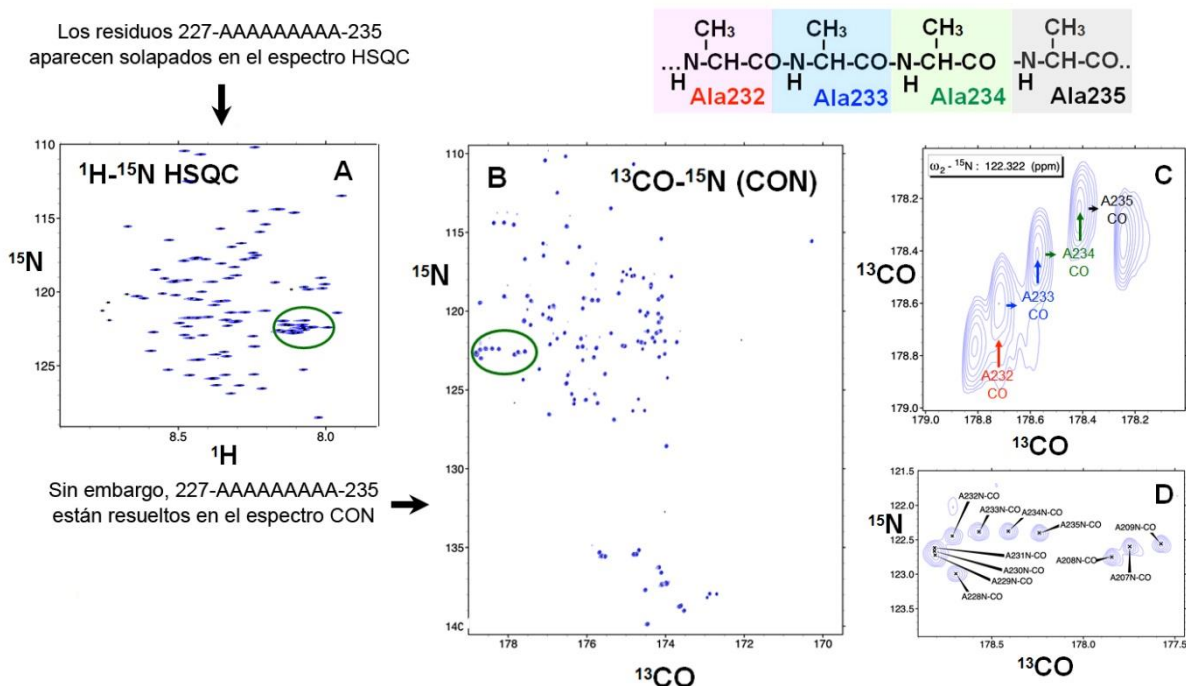
interna de desplazamiento químico fue suministrado por *Stohler Isotope Chemicals* (Waltham, EEUU). El péptido de doce residuos denominado hCPEBpep1, cuya secuencia corresponde a los 12 primeros residuos de la proteína hCPEB3 1-MQDDL LMDKSKT-12, y el péptido de veinte residuos hCPEBpep2, cuya secuencia corresponde a los residuos: 91-PPQEPAAPGASLSPSFGST-110 de la proteína hCPEB3, fueron sintetizados por *GenScript Biotech* (Piscataway, EEUU). Así pues, la secuencia del péptido hCPEBpep2 solapa con el extremo C-terminal del Segmento 1 y el extremo N-terminal del segmento 3. La pureza de los péptidos obtenida por cromatografía líquida de alta resolución HPLC fue mayor del 95% y su identidad fue confirmada por espectroscopía de masas y RMN.

Todos los espectros de los segmentos de hCPEB3 fueron adquiridos con un espectrómetro Bruker Avance 800 MHz ( $^1\text{H}$ ) equipado con una criosonda TCI de triple resonancia y gradientes Z. Una disolución de 50  $\mu\text{M}$  DSS se usó como referencia para los desplazamientos químicos del  $^1\text{H}$  medido en el mismo tampón y a la misma temperatura que los usados para los segmentos de hCPEB3. Dado que el DSS puede en ocasiones unirse a las IDPs (Diez-García et al., 2012), la señal del DSS fue registrada en un tubo de referencia independiente. Los desplazamientos químicos de referencia de  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$  se calcularon multiplicando sus respectivos radios giromagnéticos por el del  $^1\text{H}$ ; que son:  $\Xi \text{ } ^{13}\text{C} / ^1\text{H} = 0.251449530$  and  $\Xi \text{ } ^{15}\text{N} / ^1\text{H} = 0.101329118$  (Markley et al., 1998). Los espectros de RMN fueron registrados y procesados mediante la transformada de Fourier usando el programa TOPSPIN versión 2.1 (*Bruker BioSpin*: Rheinstetten, Alemania).

#### **3.4.2. Asignación de los espectros 2D y 3D**

Para mejorar y agilizar la asignación del esqueleto de la cadena polipeptídica de hCPEB3, se usó la estrategia de RMN “sin protón” para los segmentos 1, 4, 5, 6 y 8 basada en los espectros 2D CON cuyas correlaciones nucleares  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{CO}$  sucesivas se obtuvieron en dos espectros 3D llamados hacacoNcaNCO y hacaCONcaNCO (**Figura 3.2**) (Pantoja-Uceda and Santoro, 2014).





**Figura 3.2. Estrategia no convencional para la asignación de los espectros 2D CON. (A)** Limitaciones en la asignación de los espectros de RMN 2D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC para la IDR de hCPEB3 debido a la baja dispersión de los desplazamientos químicos de los protones amida. **(B)** Los espectros de RMN 2D <sup>13</sup>CO-<sup>15</sup>N proporcionan mayor resolución y permiten registrar las señales correspondientes a los residuos de prolina. **(C)** Los espectros 3D hacacoNcaNCO y hacacoNcaNCO correlaciones nucleares <sup>15</sup>N-<sup>13</sup>CO sucesivas **(D)** para asignar las señales del espectro 2D CON.

Para los segmentos 7 y 8 que forman condensados líquidos y parecen ser más rígidos, como se muestra en la **Sección 4.1.4 (Resultados)**, la estrategia permitió obtener espectros menos intensos y en particular 35 picos de cruce CON no fueron detectados. Por ello, una estrategia adicional basada en las conectividades <sup>13</sup>CO de los espectros 3D HNCO y HNcaCO. Del mismo mod, las conectividades <sup>1</sup>HN y <sup>15</sup>N de los residuos consecutivos de los espectros 3D HncocaHN y hNcocaNH fueron utilizadas para comprobar y completar las asignaciones (Pantoja-Uceda and Santoro, 2013; Sun et al., 2005). Esta estrategia se empleó también para el segmento 3 que resultó menos soluble. Para todos los segmentos, se realizó una corroboración adicional mediante los espectros 2D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC y 3D HNCO y 3D CCON para confirmar la identidad de residuo y obtener los valores de los desplazamientos químicos del núcleo <sup>13</sup>C de la cadena lateral.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

De los ocho segmentos generados, solo el segmento 2 no se produjo en cantidad suficiente pese a intentarlo mediante diferentes procedimientos de expresión y purificación. No obstante, la asignación de la secuencia fue completa gracias al análisis de los segmentos 1 y 3. Para evaluar el posible efecto de borde, el péptido hCPEBpep2 correspondiente a los residuos 91-110 de hCPEB3 fue asignado mediante los espectros 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY y 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC RMN a 5 °C en un espectrómetro Bruker 600 MHz ( $^1\text{H}$ ) equipado con una criosonda y gradientes Z. También se registró un espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC en el espectrómetro Bruker 800 MHz ( $^1\text{H}$ ). Tanto el espectro  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC como el  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC fueron registrados en abundancia natural de  $^{15}\text{N}$  y  $^{13}\text{C}$ . El programa utilizado para la asignación manual de los espectros fue RMNFAM-Sparky (Lee et al., 2015). Los parámetros de RMN espectrales se resumen en la **Tabla 8.1.4**. Los valores teóricos de los desplazamientos químicos para la conformación de ovillo estadístico se calcularon usando los parámetros tabulados por Magnus Kjaergaard, Flemming M. Poulsen y colaboradores (Kjaergaard and Poulsen, 2011; Kjaergaard et al., 2011), implementados en el servidor [https://spin.niddk.nih.gov/bax/RMNserver/Poulsen\\_rc\\_CS/](https://spin.niddk.nih.gov/bax/RMNserver/Poulsen_rc_CS/). Estos valores se usaron para obtener los desplazamientos químicos. Cuando fue apropiado, los conformeros preferidos se calcularon con el programa CYANA 3.98 (Güntert and Buchner, 2015).

#### **3.4.3. Cálculo de las constantes de acoplamiento**

Para el segmento 5, de forma adicional e independiente se registró el espectro 3D HNHA y la relación entre la intensidad del pico de cruce  $^1\text{H}\alpha$ - $^1\text{HN}$  y la intensidad de la señal de la diagonal  $^1\text{HN}$ - $^1\text{HN}$  fue utilizado para calcular las constantes de acoplamiento  $^3J_{\text{HNCH}\alpha}$ , siguiendo el procedimiento de Geerten W. Vuister y Ad Bax (Vuister and Bax, 1993). Se calcularon también las constantes de acoplamiento  $^3J_{\text{HNCH}\alpha}$  para hCPEBpep1 usando el espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY. Utilizando la ecuación de Karplus (Karplus, 1963), las constantes de acoplamiento  $^3J_{\text{HNCH}\alpha}$  pueden asociarse con el ángulo  $\phi$ , que es diferente para la estructura de  $\alpha$ -hélice, ovillo estadístico o hebra  $\beta$ .

#### **3.4.4. Medida de las tasas de relajación**

Para evaluar la dinámica en la escala de tiempo de ps-ns, se registró el NOE  $^{15}\text{N} \{^1\text{H}\}$  heteronuclear de los grupos amida de la cadena polipeptídica con y sin saturación de forma intercalada. Se usó un tiempo de demora de reciclado elevado de 13 s. Dos juegos de experimentos, uno a 25 °C y otro a 5 °C fueron registrados a 800 MHz. Las ambigüedades en las integrales de las señales fueron resueltas a partir de la desviación estándar de las intensidades de las regiones espectrales que carecen de la señal que contiene únicamente ruido. Adicionalmente, se midieron las tasas de relajación  $R_{1\rho}$ , que son sensibles a la presencia de conformeros rígidos en la escala de tiempo más lenta de  $\mu\text{s}$ -ms, registrando dos juegos de diez espectros de correlación con retrasos de relajación a 8, 300, 36, 76, 900, 100, 500, 156, 200 y 700 ms. Un juego de experimentos fue registrado a 25 °C y el otro a 5 °C.

Las tasas de relajación se calcularon por ajuste mediante el método de mínimos cuadrados de los datos a una función de decaimiento exponencial usando el programa NMRPipe (Delaglio et al., 1995). Como comprobación adicional, los datos se analizaron de forma independiente usando el programa DynamicsCenter 2.5.2. (*Bruker Biospin*).

### **3.5. Microscopía y técnicas biofísicas**

#### **3.5.1. Identificación por TEM de especies amiloides**

Todas las muestras se incubaron a 37 °C sin agitación a diferentes concentraciones en presencia de 0,02% de  $\text{NaN}_3$ , que inhibe el crecimiento de contaminantes como bacterias u hongos. Las micrografías de TEM de 50  $\mu\text{M}$  FL hCPEB3 y de 50  $\mu\text{M}$  hCPEB3 S1 fueron tomadas tras 72 horas de incubación mientras que las de 250  $\mu\text{M}$  hCPEB3 S3 se tomaron después de 144 horas. Las micrografías de TEM de 50  $\mu\text{M}$  hCPEB3 R1-3 y 10  $\mu\text{M}$  hCPEB3 R1-5 fueron tomadas tras 216 horas de incubación y las de 50  $\mu\text{M}$  hCPEB3 IDR tras 72 horas.

Se adsorbieron 10  $\mu\text{l}$  de cada muestra a una rejilla de cobre recubierta con carbono (*Ted Pella, Inc*: California, EEUU). La tinción negativa se realizó con 10  $\mu\text{l}$  de

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

una disolución de acetato de uranilo 1% (w/v) previamente filtrado durante 2 min y se realizaron dos lavados consecutivos con 10  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O. El exceso fue eliminado con papel del filtro por absorción y cada rejilla se dejó secar al aire. El análisis fue realizado en un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1200 EX II (*Jeol Limited*: Tokyo, Japón) utilizando un voltaje de excitación de 80 kV y las imágenes fueron tomadas digitalmente con una cámara CCD SIS Megaview III (*Olympus*: Tokio, Japón).

#### **3.5.2. Ensayos de fluorescencia y cinética de fibrilación**

Se preparó una disolución de 1 mM ThT (*Sigma-Aldrich*) en PBS pH 7,4. El péptido QBP1 (*Sigma-Aldrich*) se disolvió en DMSO a una concentración de 10 mM y se almacenó a -80 °C hasta su uso. El experimento de inhibición con el péptido QBP1 se realizó con 25  $\mu$ M hCPEB3 R1-3 a 25 °C en tampón PBS pH 7,4 y en presencia de 2% de DMSO. Los valores de fluorescencia ThT de emisión se midieron después de cuatro semanas de incubación. A 100  $\mu$ l de cada muestra se añadieron 5  $\mu$ l de ThT a una concentración final de 50  $\mu$ M. Los espectros fueron obtenidos a 25 °C en un espectrofluorímetro Jobin-Yvon FluoroMax-4 (*HORIBA Scientific*: Tokio, Japón) que cuenta con un módulo Peltier para controlar la temperatura. Las anchuras de la rendija de excitación y emisión fueron de 3 nm. La longitud de onda de excitación fue 440 nm y el espectro de emisión se registró de 430 a 500 nm a una velocidad de 1,0 nm/s. Los valores indicados son la media de las intensidades de la emisión de fluorescencia de ThT a 480 nm de tres experimentos independientes.

Los espectros de fluorescencia intrínseca del triptófano se registraron a diferentes temperaturas entre 300 y 400 nm utilizando una longitud de onda de excitación de 280 nm y se usaron 25  $\mu$ M hCPEB3 IDR y 25  $\mu$ M Hsp70 en los tampones 1 mM ácido acético pH 4,0 y PBS pH 7,4.

Para evaluar la hidrofobicidad superficial se utilizó una disolución de 2 mM de ANS (*Sigma-Aldrich*) que se preparó en PBS pH 7,4. La concentración final de ANS fue 40  $\mu$ M y 25  $\mu$ M hCPEB3 IDR en PBS y 1 M NaCl pH 7,4. Como control se utilizó

el tampón PBS y 3M GdmCl pH 7,4. Los registros se realizaron entre 400 y 600 nm con una longitud de onda de excitación de 350 nm.

Para obtener las curvas de la cinética de agregación amiloide se midió la intensidad de fluorescencia ThT mediante un lector de placas FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech: Ortenberg, Alemania). El tampón usado fue PBS a 25 °C en ausencia o presencia de una concentración creciente de NaCl. Para el experimento en el que se evaluó la capacidad autorreplicativa de la conformación de amiloide de hCPEB3, las fibras de amiloide se sonicaron durante 30 minutos. La concentración de hCPEB3 IDR fue siempre de 50  $\mu$ M, mientras no se especifique otra.

### **3.5.3. Análisis por FRAP de los gránulos de hCPEB3**

Para los experimentos de FRAP, el ADN que codifica para la IDR de hCPBE3 (secuencia del cebador directo: CCGCTCGAGGCATGCAGGATGATTT ACTGATG y secuencia del cebador reverso: CGGGATCCTCAGCTCCAGCG GAACGGGACGTG) y la FL de hCPEB3 (secuencia del cebador directo: CCGCTCGAGGCATGCA GGATGAT TTA CTGATG y secuencia del cebador reverso: CGGGATCCTCAAACC TGCGAAAGCTGGC) se clonó en un plásmido pEGFP-C1. Para la FL de hCPEB3, el producto de amplificación por PCR fue subclonado en un plásmido pCR2.1 mediante la estrategia de clonaje basada en el vector TA (*Invitrogen*: California, EEUU). El inserto de ADN y el producto de amplificación para la IDR de hPCEB3 fueron digeridos con las enzimas de restricción *XhoI* y *BamHI* (*New England BioLabs*).

Un día antes de la transfección, se sembraron  $2 \times 10^5$  células de neuroblastoma SH-SY5Y (cedidas amablemente por el Dr. Ricardo Martínez) en placas de Petri de 35 mm de vidrio (*Ibidi*: Múnich, Alemania). De esta forma, la confluencia era de 60-80% el día de la transfección. A continuación, 3,75  $\mu$ l de reactivo Lipofectamina 3000 (*Invitrogen*) se mezclaron con 2.5  $\mu$ g de ADN plasmídico FL hCPEB3, hCPEB3 IDR o pEGFP-C1 sin inserto como control, en medio DMEM/F12 sin suero. Los complejos ADN-lípido se incubaron 15 min a temperatura ambiente antes de ser añadidos uniformemente a las células. Las células transfectadas se incubaron durante 36 horas antes de ser analizadas. Las células se visualizaron utilizando un microscopio de

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

fluorescencia Leica DMI 6000 (*Leica Microsystems: Wetzlar, Alemania*) con un filtro de excitación, BP 470/40 un filtro de emisión BP 525/50 y un espejo dicromático 500.

El experimento de FRAP se realizó utilizando un microscopio confocal invertido Leica TCS SP5 (*Leica Microsystems*). La captura de imágenes en modo intervalo de tiempo de las muestras fueron tomadas usando un láser de argón a 488 nm durante 1 min a un fotograma por segundo con un objetivo de inmersión HCX PL APO CS 40.0X. Para el análisis de datos, se midió la intensidad de fluorescencia de dos regiones de interés (ROI). La ROI-1 corresponde al fotoblanqueo total del condensado biomolecular, mientras que la ROI-2 fue definida como el fondo y esta señal fue sustraída del ROI-1. La gráfica de tiempo frente a intensidad de fluorescencia corregida de fotoblanqueo fue expresada en forma normalizada con respecto a la intensidad del pre-fotoblanqueo. Se usó la intensidad relativa de 8 gránulos por condición de distintas células de tres transfecciones transitorias diferentes para calcular la media y la desviación estándar. Las imágenes fueron analizadas usando el software Leica LAS AF Lite. Las constantes de la velocidad de recuperación de la señal tras fotoblanqueo se calcularon por ajuste a una función de decaimiento exponencial mediante el método de mínimos cuadrados usando el programa Kaleidograph a partir de los datos experimentales.

#### **3.5.4. Determinación por CD de la estructura general**

Para determinar la estructura secundaria general se registraron los espectros de CD en la región del ultravioleta lejano para la región hCPEB3 IDR a una concentración de 5-10  $\mu\text{M}$  en un tampón de 1 mM ácido acético pH 4,0 y otro de 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1 M NaF pH 7,4. El equipo utilizado fue un espectropolarímetro JASCO-J810 (*JASCO Inc.: Maryland, EEUU*) equipado con un módulo Peltier para controlar la temperatura y una cubeta de cuarzo cuyo paso de luz es de 1 mm. Se obtuvieron 4 registros que fueron promediados y a los que se sustrajo la contribución del tampón. Los espectros fueron obtenidos desde 260 a 190 nm a la velocidad de 20 nm/min. El ancho de banda fue de 1,25 nm con un paso de datos de 0,5 nm.

## 3.6. Ensayos de citotoxicidad

### 3.6.1. *Immunodot blot*

Se depositaron 2  $\mu$ l de cada muestra sobre una membrana de nitrocelulosa de 0,45  $\mu$ m (*GE Healthcare*). Tras bloquear la membrana durante 45 min a temperatura ambiente con una disolución de leche desnatada al 10% (*Bio-Rad*: California, EEUU) en TBS 0,01% Tween 20 (TBS-T) pH 7,4 con agitación suave, se lavó 5 veces durante 5 min con TBS-T. A continuación, se incubó la membrana con el anticuerpo específico anti-oligómero A11 (*Thermo Scientific*: Delaware, EEUU) diluido 1:2000, el anticuerpo  $\alpha$ APF diluido 1:1000 (cedido amablemente por Rakez Kayed) y el anticuerpo OC específico para fibras de amiloide (*Millipore*) diluido 1: 1000 en leche desnatada al 5% en TBS-T, durante una hora a temperatura ambiente. Tras lavar la membrana 5 veces durante 5 min con TBS-T, se incubó durante 1 hora con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo IRDye 680LT (*LI-COR Biosciences*: Lincoln, EEUU) y se midió la fluorescencia con un aparato Odyssey CLx (*LI-COR Biosciences*).

La concentración de las regiones y segmentos de hCPEB3 fueron las siguientes: [FL hCPEB3] = 50  $\mu$ M; [hCPEB3 IDR] = 25  $\mu$ M; [hCPEB3 S1] = 0,3 mM; [hCPEB3 R1-3] = 0,5 mM; [hCPEB3 R1-5] = 0,2 mM; [hCPEB3 S5] = 0,1 mM. Finalmente, 20  $\mu$ M de fibras de amiloide de  $A\beta_{42}$  y 60  $\mu$ M BSA fueron usados como controles positivo y negativo respectivamente.

El péptido sintético de  $A\beta_{42}$  se compró a *Shanghai RD Biosciences LTD*. Para la obtención de fibras de amiloide, se disolvieron 4,0 mg del péptido en 800  $\mu$ l de HFIP durante 15 min a 4 °C. Se evaporó el HFIP bajo corriente de  $N_2$  y a continuación el péptido se disolvió en DMSO a una concentración de 1 mM. Se añadió  $H_2O$  hasta una concentración final de 50  $\mu$ M y se incubó durante 3 días a temperatura ambiente. A continuación, las fibras de amiloide de  $A\beta_{42}$  se sonicaron durante 30 min para obtener núcleos preformados de amiloide.

### 3.6.2. *Determinación de la viabilidad y muerte celular*

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

El efecto de las diferentes especies amiloidogénicas formadas por la IDR de hCPEB3 se evaluó mediante diferentes ensayos de viabilidad celular. Para la obtención de oligómeros solubles, se incubaron 50  $\mu\text{M}$  hCPEB3 IDR en forma de monómero en PBS pH 7,4 a 37 °C durante 24 horas. A continuación, se colectó la fracción del sobrenadante tras centrifugar a 14.000 x *g* durante un breve pulso. Para la obtención de fibras de amiloide de la IDR de hCPEB3, se incubaron 50  $\mu\text{M}$  hCPEB3 IDR en forma de monómero en PBS pH 7,4 a 37 °C durante 72. horas. A continuación, se colectó la fracción insoluble que contiene las fibras de amiloide centrifugando a 14.000 x *g* durante un breve pulso y se sonicaron durante 15 min. Para evaluar la viabilidad celular se utilizó el ensayo de luminiscencia CellTiter-Glo (*Promega*: Wisconin, EEUU) en placas opacas blancas de 96 pocillos. Se sembraron 2 x 10<sup>4</sup> células de neuroblastoma SH-SY5Y por pocillo en medio GlutaMAX DMEM/F12 1:1 (*Thermo Scientific*) suplementado con 10% FBS y 1% de penicilina / estreptomicina. Cada una de las muestras se incubó con las células durante 24 horas.

Para los experimentos con la chaperona Hsp70, los oligómeros de hCPEB3 IDR se produjeron a partir de la proteína en forma monómerica a la concentración indicada en la figura y se usó una concentración inicial de 50  $\mu\text{M}$  cuando se co-incubó con la chaperona. Las células fueron tratadas durante 24 horas con cada muestra. A continuación, se dejó la placa a temperatura ambiente durante 30 min y se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de reactivo CellTiter-Glo a cada pocillo. Tras 2 min con agitación suave que facilita la lisis de las células, la placa se mantuvo durante 10 min protegida de la luz para permitir la estabilización de la señal. La luminiscencia fue medida usando un lector de placas FLUOstar OPTIMA. Cada experimento fue realizado por triplicado. El valor de luminiscencia de las células control sin tratar fue considerado el 100% de viabilidad.

Para el ensayo de muerte celular con yoduro de propidio-anexina V (*Sigma-Aldrich*), se sembraron 8 x 10<sup>4</sup> células de neuroblastoma SH-SY5Y en una placa de 24 pocillos y fueron tratadas durante 24 horas con los oligómeros solubles formados a partir de 50  $\mu\text{M}$  en forma de monómero. Las células se recolectaron por tratamiento con tripsina, se lavaron con PBS, se resuspendieron en 500  $\mu\text{l}$  de tampón de unión 0,5 ng/ml anexina V, 2,0 ng/ml de yoduro de propidio y se incubaron durante 15 min



en oscuridad. Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo BD FACSAria y los datos se registraron utilizando el software FlowJo.

**Parte IV**  
**RESULTADOS**

## **IV. RESULTADOS**

---

### **4.1. Estudio por RMN de hCPEB3**

#### **4.1.1. Estructura general de la IDR**

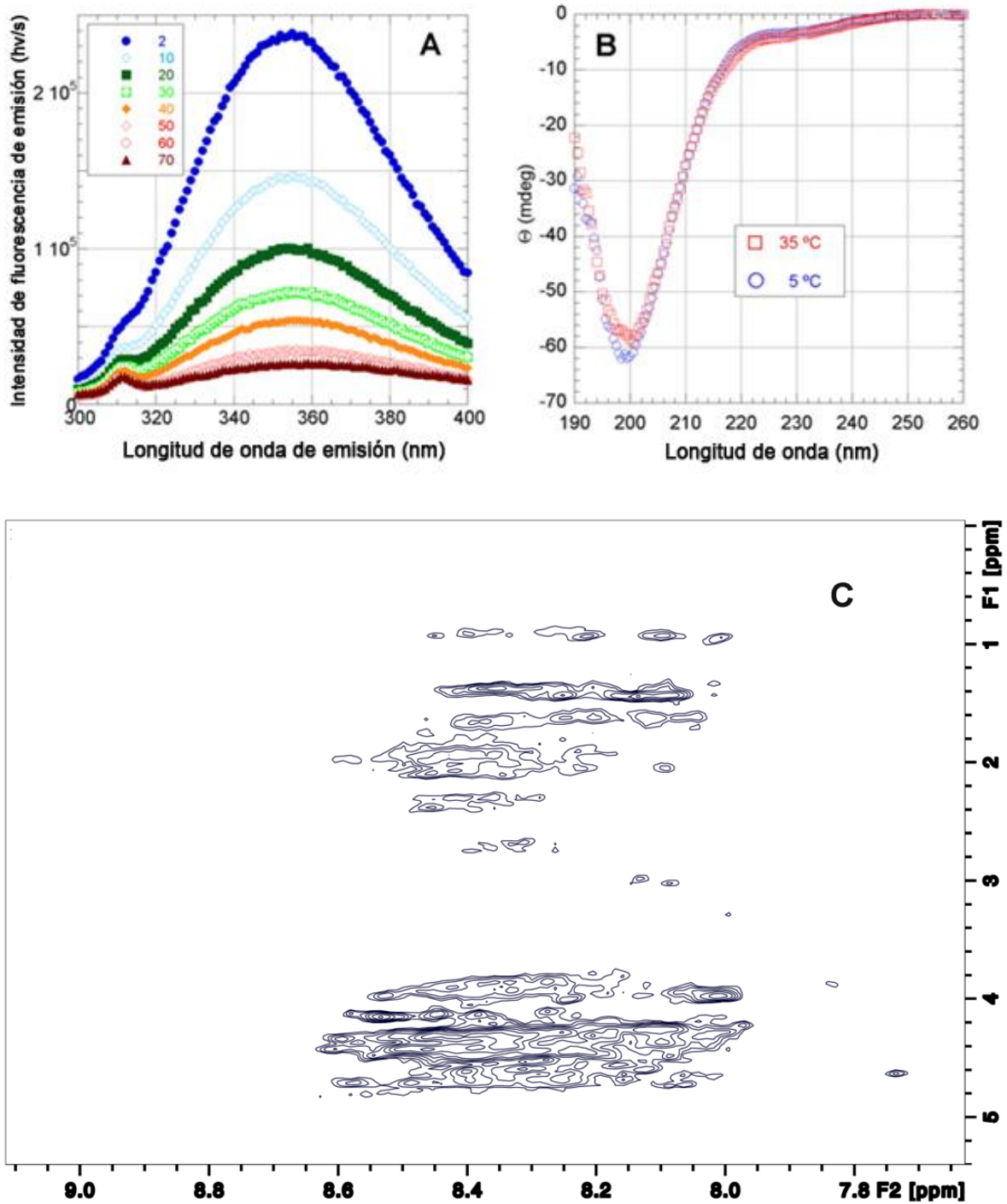
El alineamiento de las secuencias de la proteína CPEB3 de distintas especies modelo de vertebrados realizado con el programa T-Coffee se muestra en la **Figura 4.1**. Resultados similares se obtuvieron utilizando el programa Omega Clustal. Si bien en general la mayoría de IDPs muestra bajos niveles de conservación de secuencia, algunas zonas de la secuencia de hCPEB3 ricas en residuos hidrófobos como M1-T12, W111-F139 y Y341-I357 están altamente conservadas. Por el contrario, los segmentos ricos en residuos de glutamina, alanina y prolina solo están presentes en mamíferos.

Como primera aproximación para caracterizar experimentalmente la IDR de hCPEB3, se han utilizado técnicas biofísicas y RMN homonuclear. El espectro de emisión de fluorescencia, registrado en el rango de temperatura de 2 °C a 70 °C muestra un máximo a > 350 nm. Estos resultados muestran que los seis residuos de triptófano se encuentran expuestos al solvente y no formando un núcleo hidrófobo a dominio plegado (**Figura 4.2A**) (Alston et al., 2004).

El espectro de CD en el UV lejano de la IDR de hCPEB3 que presenta un mínimo cerca de 200 nm también es el característico de las IDPs (Denning et al., 2003). No se identificó ninguna característica espectral indicativa de estructuras en forma de hélice  $\alpha$  o lámina  $\beta$  caracterizadas por mínimos a 208, 218 o 222 nm y ningún mínimo a 195 nm (**Figura 4.2B**).

Los espectros 1D  $^1\text{H}$  and 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY muestran las señales  $^1\text{H}$  agrupadas en bandas anchas similares a los valores observados para otros polipéptidos que carecen de estructura (**Figura 4.2C**) (Bundi and Wüthrich, 1979; López-Alonso et al., 2010). Por ello, aunque se puede descartar la presencia de dominios plegados de forma estable, sin embargo, cabe la posibilidad de que existan pequeños segmentos con estructura secundaria parcial.





**Figura 4.2: Caracterización biofísica de la IDR de hCPEB3.** (A) Espectro de emisión de fluorescencia de la IDR de hCPEB3 en 1 mM de ácido acético deuterado a pH 4,0 en el rango de temperatura de 2 °C a 70 °C. El máximo de emisión a 350 nm es indicativo de la exposición de los residuos de triptófano al medio y la ausencia de un núcleo hidrófobo plegado. (B) Espectro CD-UV lejano de la IDR de hCPEB3 a 5 °C y 35 °C. El mínimo observado a 200 nm y la ausencia de mínimos a 208, 218 y 222 nm y de un máximo a 195 nm son característicos de una conformación de ovillo estadístico. (C) Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY de la IDR de hCPEB3 a 25 °C que muestra la región de las picos de cruce. La escasa dispersión en los desplazamientos químicos de  $^1\text{HN}$  (entre 8,6 y 7,9 ppm) es una característica típica de las proteínas desplegadas y desordenadas (López-Alonso et al., 2010).



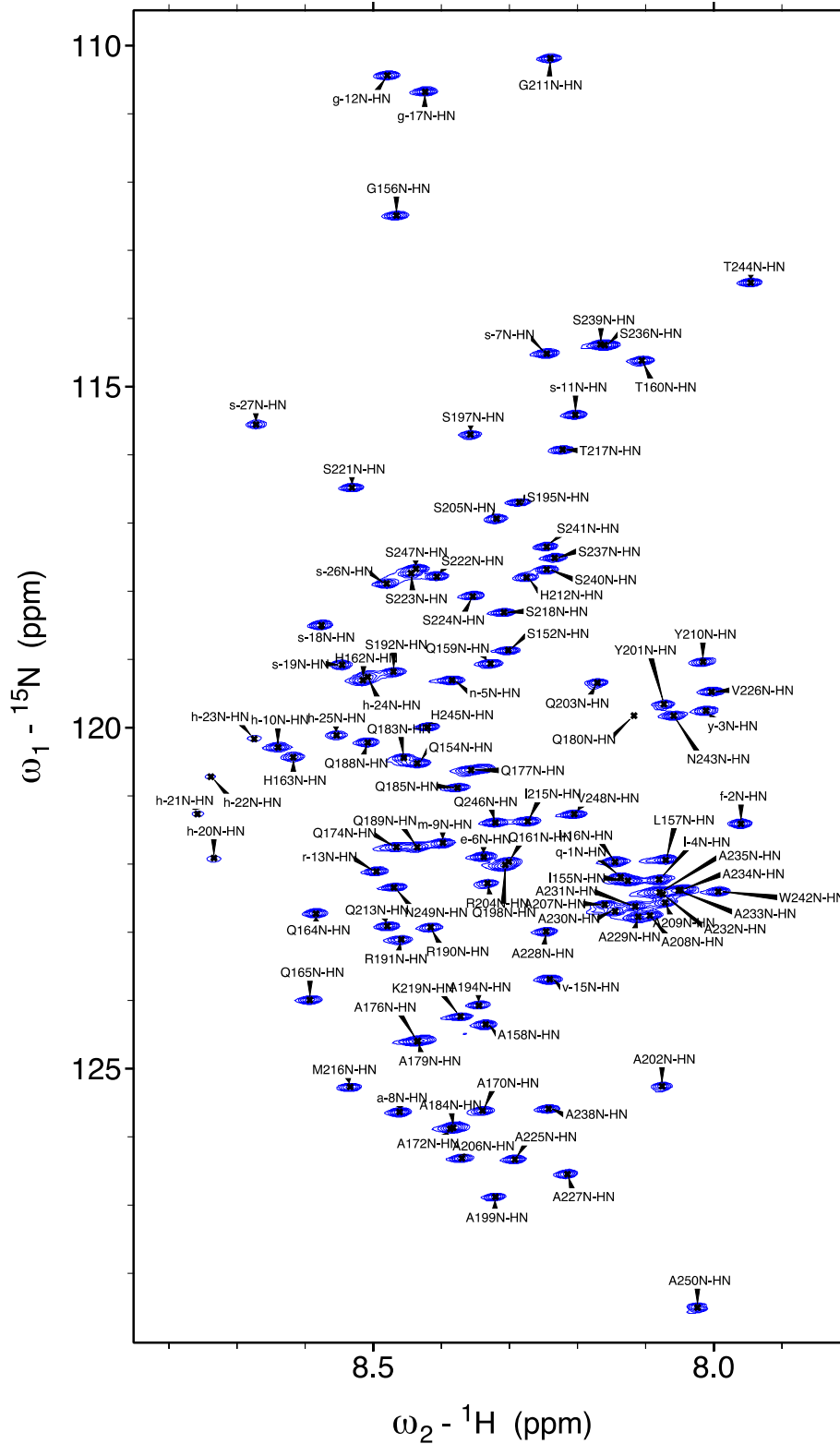
## IV, RESULTADOS

### **4.1.2. Elementos con estructura parcial**

Con el objetivo de identificar y caracterizar posibles segmentos con estructura secundaria parcial, se ha utilizado la RMN heteronuclear multidimensional. Dado que la cadena polipeptídica de la IDR es demasiado larga para ser caracterizada por esta metodología en un único experimento, se ha seguido una estrategia de “divide y vencerás” implementada por Markus Zweckstetter y sus colaboradores para caracterizar tau, una IDP de tamaño similar implicada en la enfermedad de Alzheimer y otras taupatías (Mukrasch et al., 2009), la cual es a día de hoy la proteína de mayor tamaño resuelta a nivel atómico por RMN. Como se ha descrito en la **Sección 3.2 (Materiales y Métodos)**, se han caracterizado 8 segmentos solapantes de 100 residuos (**Tablas 8.1.1, 8.1.2 y 8.1.3**). Utilizando la potente estrategia de asignación basada en  $^{13}\text{CO}$ ,  $^{15}\text{N}$  y  $^1\text{HN}$ , se asignaron más del 99% de las resonancias espectrales de  $^{13}\text{CO}$ ,  $^{13}\text{C}\alpha$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{HN}$  de la cadena principal y  $^{13}\text{C}\beta$  para los residuos 1-450 de hCPEB3. De forma representativa, se muestran los espectros 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC y 2D  $^{13}\text{CO}$  $^{15}\text{N}$  asignados del segmento 4 (residuos 152-250) en la **Figura 4.3** y **Figura 4.4** respectivamente. Los desplazamientos químicos de la IDR de hCPEB3 están registrados en el banco de datos BMRB (número de entrada: 50256). Diferentes intentos de expresar y purificar el segmento 2 de hCPEB3 (residuos 51-150) no tuvieron éxito. Sin embargo, estos residuos están presentes en los segmentos 1 (residuos 1-100) y 3 (residuos 101-200) y han sido caracterizados estructuralmente. Para comprobar si pudiese existir estructura entre los residuos 91-110 correspondientes a la parte central del segmento 2 y a los extremos C- y N-terminal de los segmentos 1 y 3 respectivamente, se estudió la conformación del péptido hCPEBpep2 por espectroscopía RMN no detectándose ninguna tendencia significativa hacia la formación de estructura secundaria estable (**Figura 4.5**).

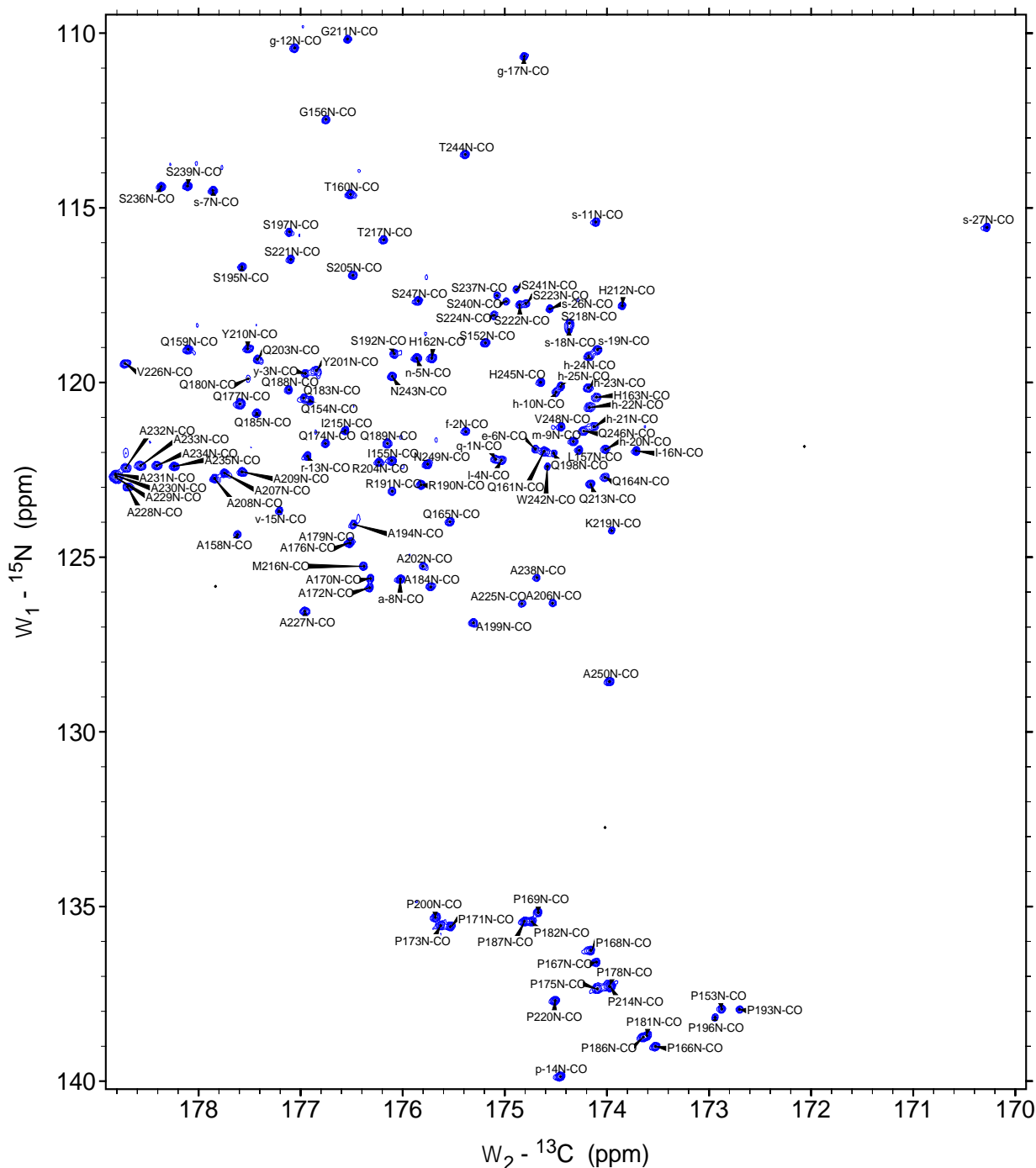
### **4.1.3. Repeticiones de glutamina**

Los desplazamientos químicos conformacionales indican la formación de una hélice  $\alpha$  parcial adoptada por los primeros diez residuos de la proteína (**Figura 4.6A y 4.6B**). También se observó un aumento de los desplazamientos químicos conformacionales a 5 °C que refleja una mayor cantidad de estructura en forma de hélice. Del mismo modo, las medidas de relajación detectan que estos residuos constituyen la parte más rígida del segmento 1 (**Figura 4.6C y 4.6D**).



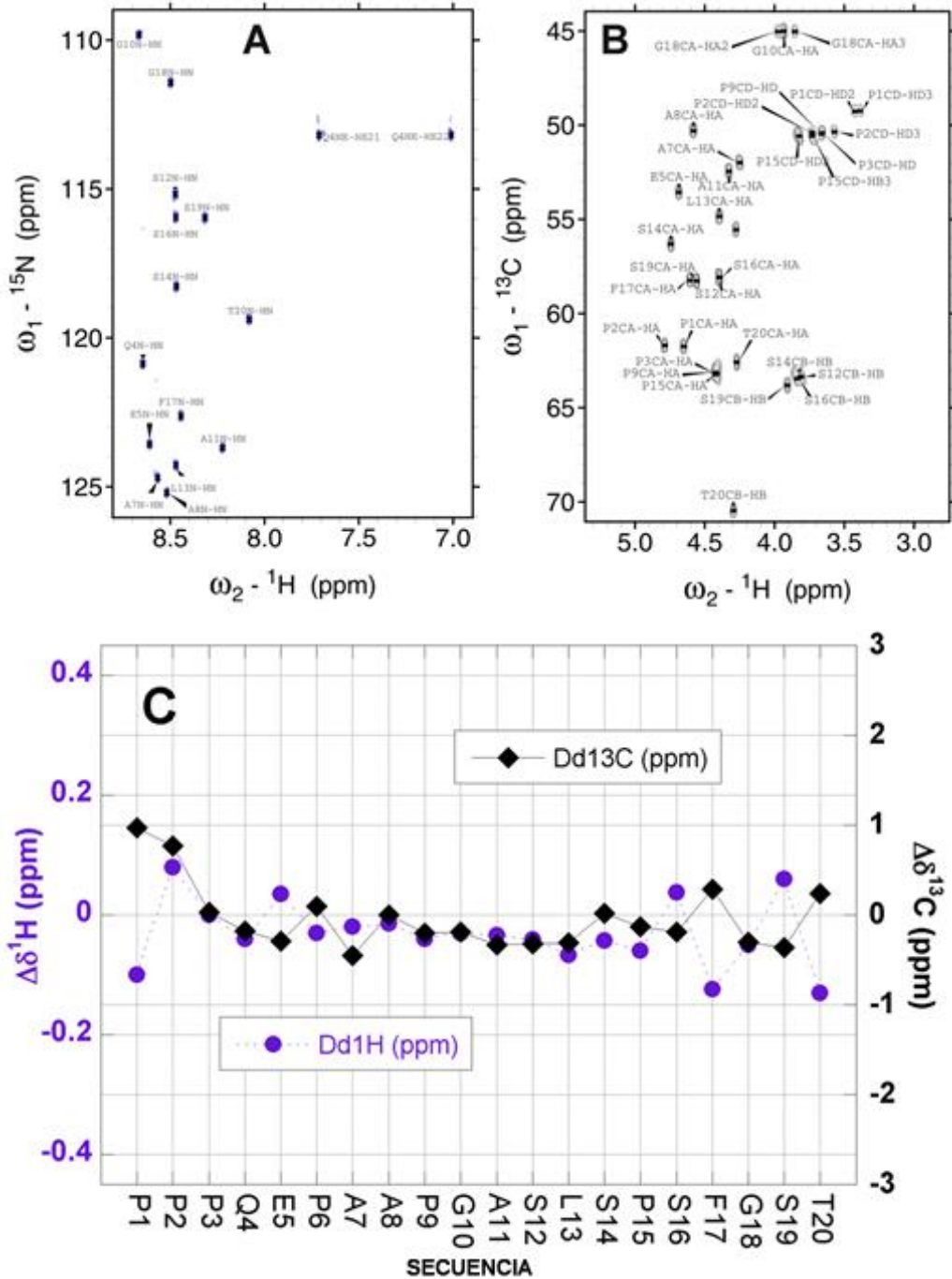
**Figura 4.3: Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC del segmento 4.** Las correlaciones  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  fueron registradas a 25 °C en 1 mM ácido acético deuterado a pH 4,0. Nótese el grupo de señales de alanina pertenecientes al segmento polialanina cerca de 8,05 ppm para  $^1\text{H}$  y 122,5 ppm para  $^{15}\text{N}$ . Su posición contrasta con la de los residuos de alanina aislados cuya  $\delta^{15}\text{N} > 125$  ppm. Las señales identificadas con números negativos en minúscula corresponden a la etiqueta His-TEV (-29)-MGSSH HHHHHSSGLVPRGSHMASENLYFQ(-1).

## IV, RESULTADOS



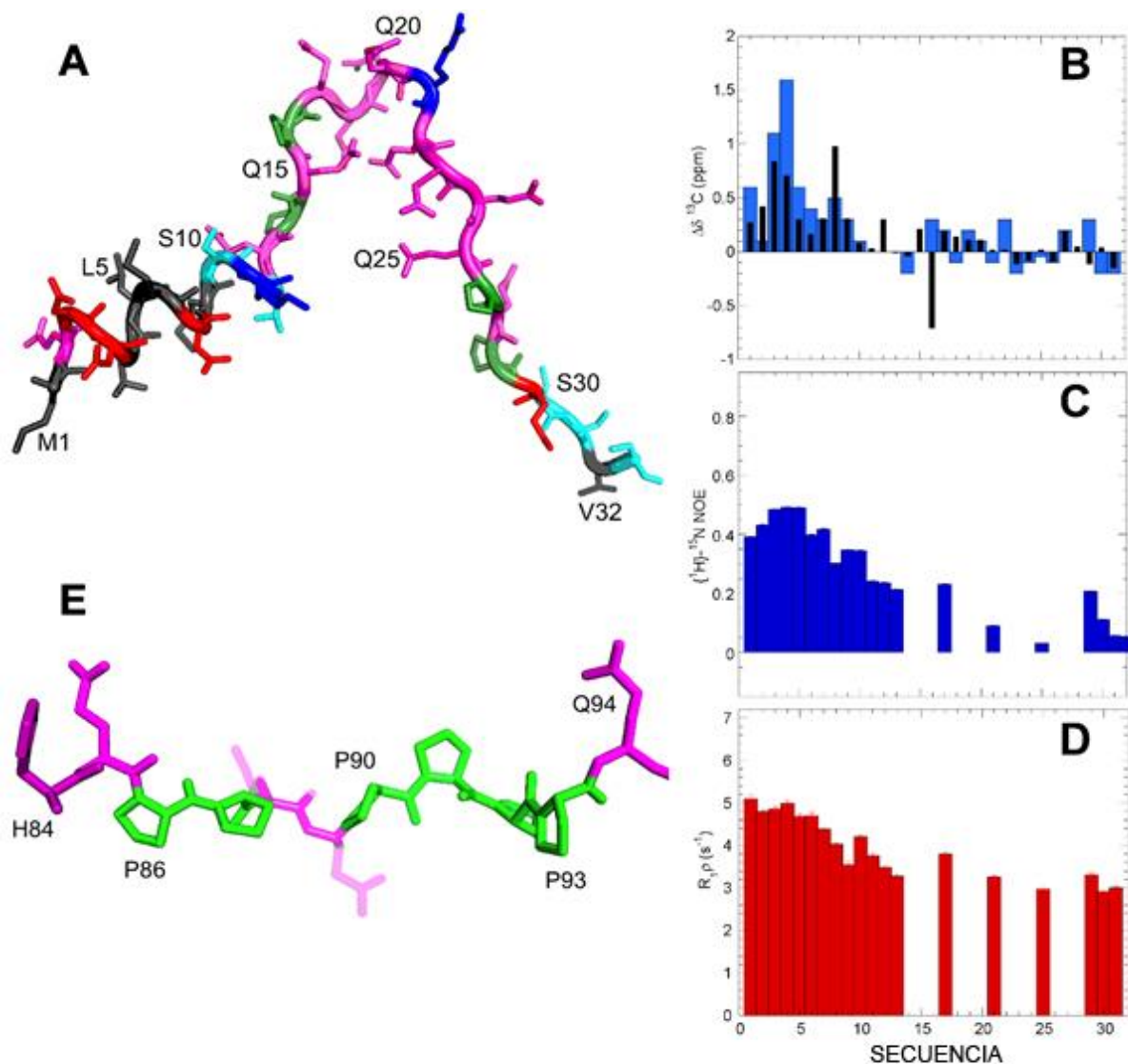
**Figura 4.4:** Espectro 2D  $^{13}\text{CO}-^{15}\text{N}$  del segmento 4. Las correlaciones  $^{13}\text{CO}-^{15}\text{N}$  fueron registradas a 25 °C en 1 mM ácido acético deuterado a pH 4,0. Aquí, las señales del segmento de polialanina, que aparece en torno a 122,5 ppm para  $^{15}\text{N}$  y 178,5 ppm para  $^{13}\text{CO}$  muestra una mayor resolución con respecto al espectro  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HSQC. Su posición a mayor y menor valor de los desplazamientos químicos para  $^{13}\text{CO}$  y  $^{15}\text{N}$  respectivamente con respecto a los residuos de alanina aislados en forma de ovillo estadístico indican la conformación de una hélice  $\alpha$ . Las señales identificadas con números negativos en minúscula corresponden a la etiqueta His-TEV (-29)-MGSSHHHHHHSSGLVPRG SHMASENLYFQ(-1).



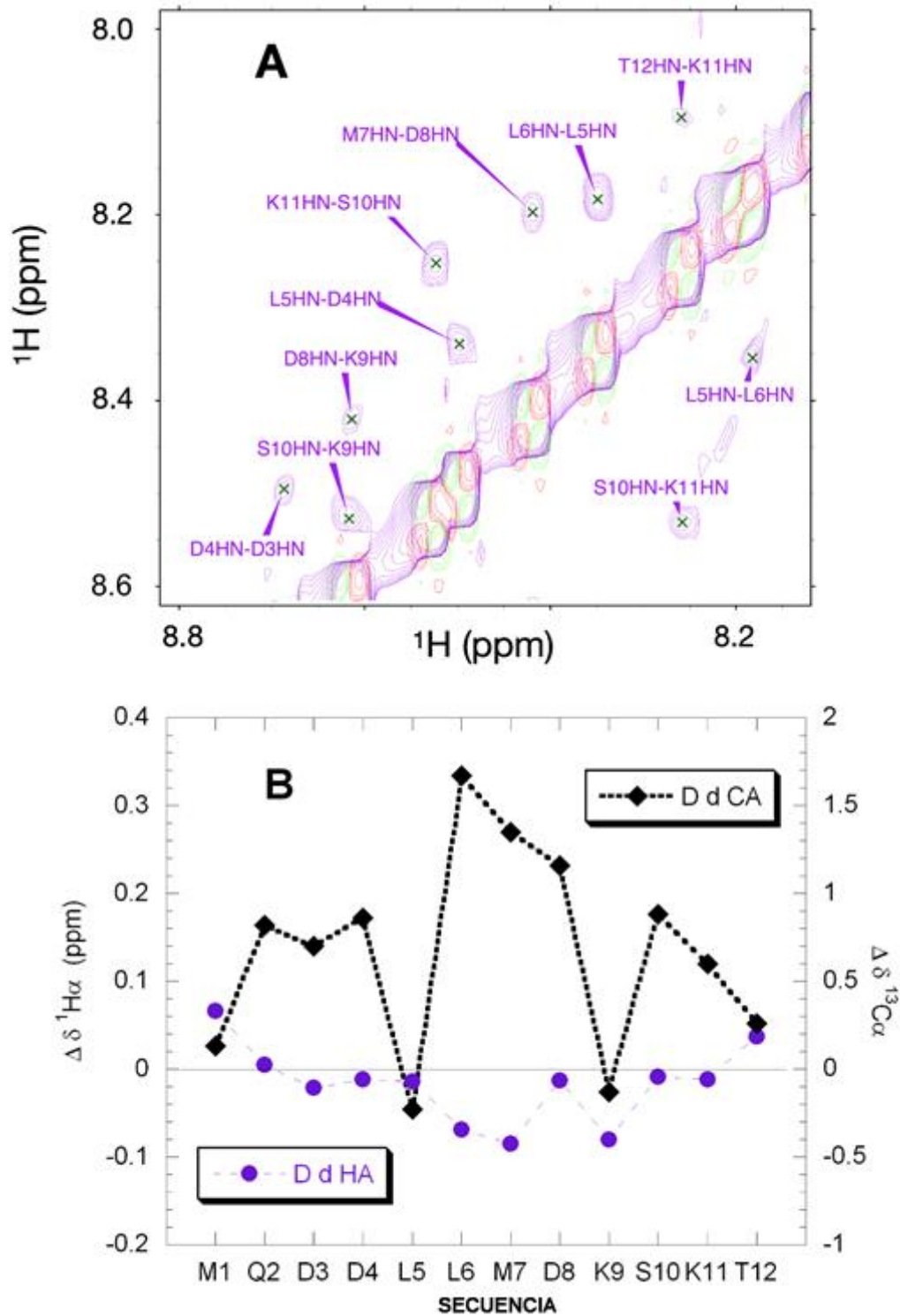


**Figura 4.5: Espectros 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC y  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC y desplazamientos químicos conformacionales de los residuos 91-110. (A)** Asignación del espectro  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC del péptido correspondiente a los residuos 91-110 (hCPEBpep2). La baja dispersión de los desplazamientos químicos en la dimensión  $^1\text{HN}$  es un distintivo de estructura en forma de ovillo estadístico. Las etiquetas de numeración corresponden a la posición que ocupan los residuos en el péptido, no a su posición en la secuencia de hCPEB3. **(B)** Espectro  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC correspondiente a hCPEBpep2 en el que se muestra la asignación de  $^1\text{H}\alpha$ - $^{13}\text{C}\alpha$ ,  $^1\text{H}\delta$ - $^{13}\text{C}\delta$  de los residuos de prolina y  $^1\text{H}\beta$ - $^{13}\text{C}\beta$  de serina y treonina. **(C)** Desplazamientos químicos conformacionales de  $^1\text{H}\alpha$  (eje y a la izquierda, en morado) y  $^{13}\text{C}\alpha$  (eje y a la derecha, en negro). Los valores de -0,41 ppm ( $^1\text{H}$ ) y +3,1 ppm ( $^{13}\text{C}$ ) corresponden a una conformación del 100% en forma de hélice  $\alpha$  y los valores de +0,41 ppm ( $^1\text{H}$ ) y -3,1 ppm ( $^{13}\text{C}$ ) corresponden con una estructura del 100% en forma de hebra  $\beta$ .

## IV, RESULTADOS



**Figura 4.6: Hélice  $\alpha$  parcial del extremo N-terminal y hélice PPII de los residuos 84-94.** El extremo N-terminal de hCPEB3 contiene un segmento en forma de hélice  $\alpha$  y un segmento Q<sub>4</sub>RQ<sub>4</sub> amiloidogénico separados por dos motivos PQP actuando como interruptores. Un conformero representativo (A) de los primeros 32 residuos de una familia de 20 estructuras calculadas usando el programa CYANA basada en la restricción de los ángulos del esqueleto de la cadena polipeptídica obtenida mediante el programa TALOS+ a partir de los valores de los desplazamientos químicos. Los residuos no polares se muestran en negro, los aromáticos en violeta, Q/N en magenta, E/D en rojo, K/R en azul, prolina en verde y C/S/T en cian. Se debe tener en cuenta que este conformero muestra una hélice  $\alpha$  en el extremo N-terminal a pesar de que otros conformeros completamente desordenados dominan el conjunto de conformaciones. (B) Los desplazamientos químicos conformacionales  $^{13}\text{C}\alpha$  (azul) y  $^{13}\text{C}\text{O}$  (negro) indican una proporción de ~15-20% de hélice  $\alpha$  a 25 °C. Las medidas de relajación (C)  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  NOE y (D)  $R_{1\rho}$  indican que la conformación de hélice  $\alpha$  es menos móvil que el segmento poliglutamina en las escalas de tiempo de ps-ns y de  $\mu\text{s}$ -ms respectivamente a 25 °C. Las barras de error indican la incertidumbre estimada  $<0,01$  para hNOE y  $<0,10 \text{ s}^{-1}$  para  $R_{1\rho}$ . Hay valores que no aparecen indicados en los paneles C y D es a causa del solapamiento de las señales  $^1\text{H}^{15}\text{N}$  o a la falta de las señales en el caso de los residuos de prolina. (E) Estructura representativa de una familia de 20 conformeros del segmento rico en residuos de prolina H84-Q94. Los residuos 86-94 adoptan una estructura de hélice PPII. El código de colores es el mismo que aparece indicado en el panel A.



**Figura 4.7: Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY de RMN y desplazamientos químicos conformacionales de los residuos del extremo N-terminal. (A)** Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY (tiempo de mezcla 80 ms, morado) del péptido correspondiente a los primeros residuos de hCPEB3 (hCPEBpep1). Las correlaciones NOE secuenciales, que son consistentes con la estructura en forma de hélice  $\alpha$  aparecen señalizadas. Los picos en rojo y verde a lo largo de la diagonal corresponden al espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY. **(B)** Desplazamientos químicos conformacionales  $^1\text{H}$  (morado) y  $^{13}\text{C}$  (negro) a 5  $^\circ\text{C}$  para el péptido hCPEBpep1 en presencia de 20% de HFIP. Los valores positivos de  $\Delta\delta^{13}\text{C}$  y negativos de  $\Delta\delta^1\text{H}$  son indicativo de la formación significativa de estructura en forma d hélice  $\alpha$ .

## IV, RESULTADOS

Esta conformación de hélice  $\alpha$  detectada para estos primeros residuos incluye la etiqueta N-terminal de polihistidina seguida de un sitio de corte para la proteasa TEV N1 $\alpha$ . Aunque la presencia de esta etiqueta no parece aumentar la población de estructuras en forma de hélice  $\alpha$  del resto de segmentos estudiados, para descartar un posible efecto promotor de estructura secundaria estable en el segmento 1, en primer lugar se intentó eliminar la etiqueta mediante corte proteolítico con la proteasa TEV. Sin embargo, los diferentes intentos llevados a cabo fracasaron, lo que sugiere que la hélice  $\alpha$  que va de los últimos residuos de la etiqueta a los primeros residuos de la IDR de hCPEB3 está realmente presente e impide el corte proteolítico.

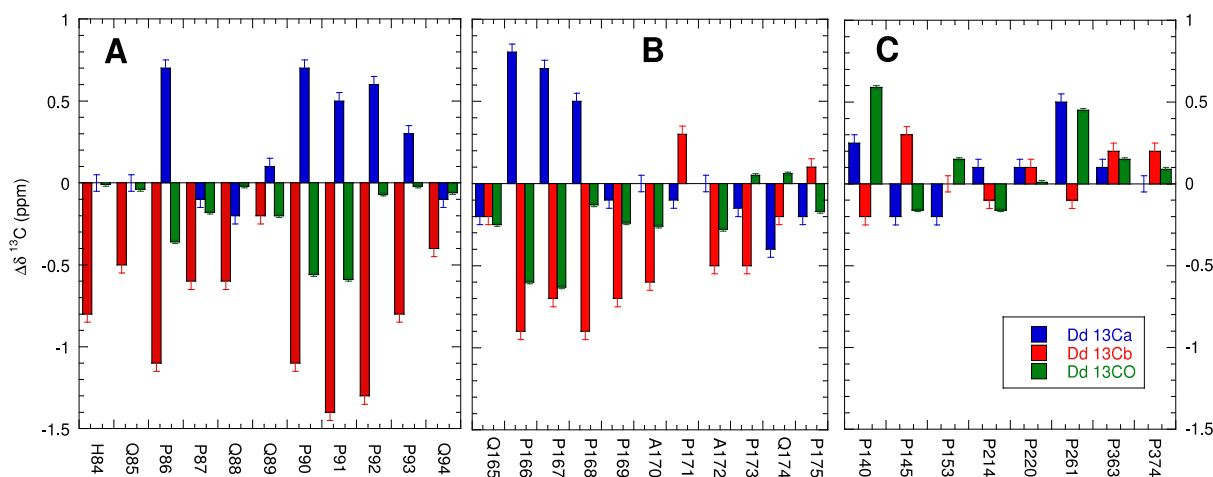
Por ello, se caracterizó un dodecapéptido cuya secuencia 1-MQD DLLMDKSKT-12 corresponde a los doce primeros residuos de la IDR de hCPEB3. La presencia de picos de cruce débiles por efecto Overhauser nuclear  $^1\text{H}_{\text{Ni}} - ^1\text{H}_{\text{Ni}+1}$  demuestran que el péptido tiene una ligera tendencia a formar estructura de hélice  $\alpha$  en medio acuoso (**Figura 4.7A**). Los alcoholes fluorados como el 2,2,2-trifluoroetanol o el HFIP se sabe que incrementan el porcentaje de conformación helicoidal en péptidos que tienen tendencia a adoptar una estructura de hélice  $\alpha$ , pero no en péptidos con preferencia por una estructura de hebra  $\beta$  u ovillo estadístico (Muñoz et al., 1995). En presencia de 20% de HFIP, la proporción de estructura hélice  $\alpha$  se ve incrementada significativamente como muestran el aumento y la intensidad de los picos de cruce NOE, así como los desplazamientos químicos conformacionales  $^1\text{H}_\alpha$  y  $^{13}\text{C}_\alpha$  (**Figura 4.7B**). Estos experimentos confirman que los 12 primeros residuos de hCPEB3 tienden a adoptar una estructura de hélice  $\alpha$ .

### **4.1.4. Repeticiones de prolina**

Resulta muy interesante el hecho de que el segmento rico en residuos de glutamina, 16-QQQRQQQ-24 no adopte ninguna estructura ni en forma de hélice  $\alpha$  ni de hebra  $\beta$  apareciendo completamente desordenado y flexible (**Figura 6.4A y 6.4B**). Además, está precedido y seguido de un motivo tripéptido 13-PQP-15 y 25-PQP-27. Considerando el efecto inhibitorio para la formación de amiloide de los residuos de prolina previamente descritos para la huntingtina por Ronald Wetzel y sus colaboradores (Bhattacharyya et al., 2006), es probable que estos pequeños motivos

actúen como elemento de control de la amiloidogénesis del segmento de poliglutamina.

Los primeros 100 residuos contienen también un segmento rico en residuos de prolina 86-PQQPPPPQEPAAAG-100. Cabe destacar que los residuos de prolina poseen una gran tendencia intrínseca a adoptar una estructura de hélice PPII (Kelly et al., 2001) y este tipo de secuencias se han relacionado con una mayor solubilidad de las poliglutaminas en otras proteínas (Bhattacharyya et al., 2006; Thakur et al., 2004). A pesar de que estudios recientes en los que se describen criterios para su identificación por RMN, permiten descartar que este segmento forme un manojito de hélices PPII (Treviño et al., 2018), los residuos 86-93 sí adoptan una hélice PPII aislada parcial (**Figura 4.6E**). De hecho, los residuos de prolina consecutivos muestran un patrón de desplazamientos químicos conformacionales característico; -0,6 ppm, -1,0 ppm y +0,3 ppm para  $^{13}\text{C}\alpha$ ,  $^{13}\text{C}\beta$  y  $^{13}\text{C}\text{O}$  respectivamente (**Figura 4.8**). Dado que estos valores no se observan en residuos de prolina aislados, se propone que son distintivos de la conformación de hélice PPII.



**Figura 4.8: Desplazamientos químicos conformacionales de los residuos de prolina. (A) y (B)** muestran los desplazamientos químicos conformacionales  $\Delta\delta$  para  $^{13}\text{C}\alpha$  (azul),  $^{13}\text{C}\beta$  (rojo) y  $^{13}\text{C}\text{O}$  (verde) de los residuos de prolina de dos segmentos, 84-94 y 165-175, cada uno de los cuales contiene cuatro residuos de prolina consecutivos en la conformación de hélice PPII. Los valores de  $\Delta\delta$  de los residuos P90, P91, P92, P166, P167 y P168 fueron promediados para obtener los valores recogidos en la **Tabla 5.3**. **(C)** Los residuos de prolina aislados, es decir aquellos que no presentan otro residuo de prolina en dos posiciones anteriores o posteriores en la secuencia, no muestran el patrón de desviaciones  $\Delta\delta$  característico.

## IV, RESULTADOS

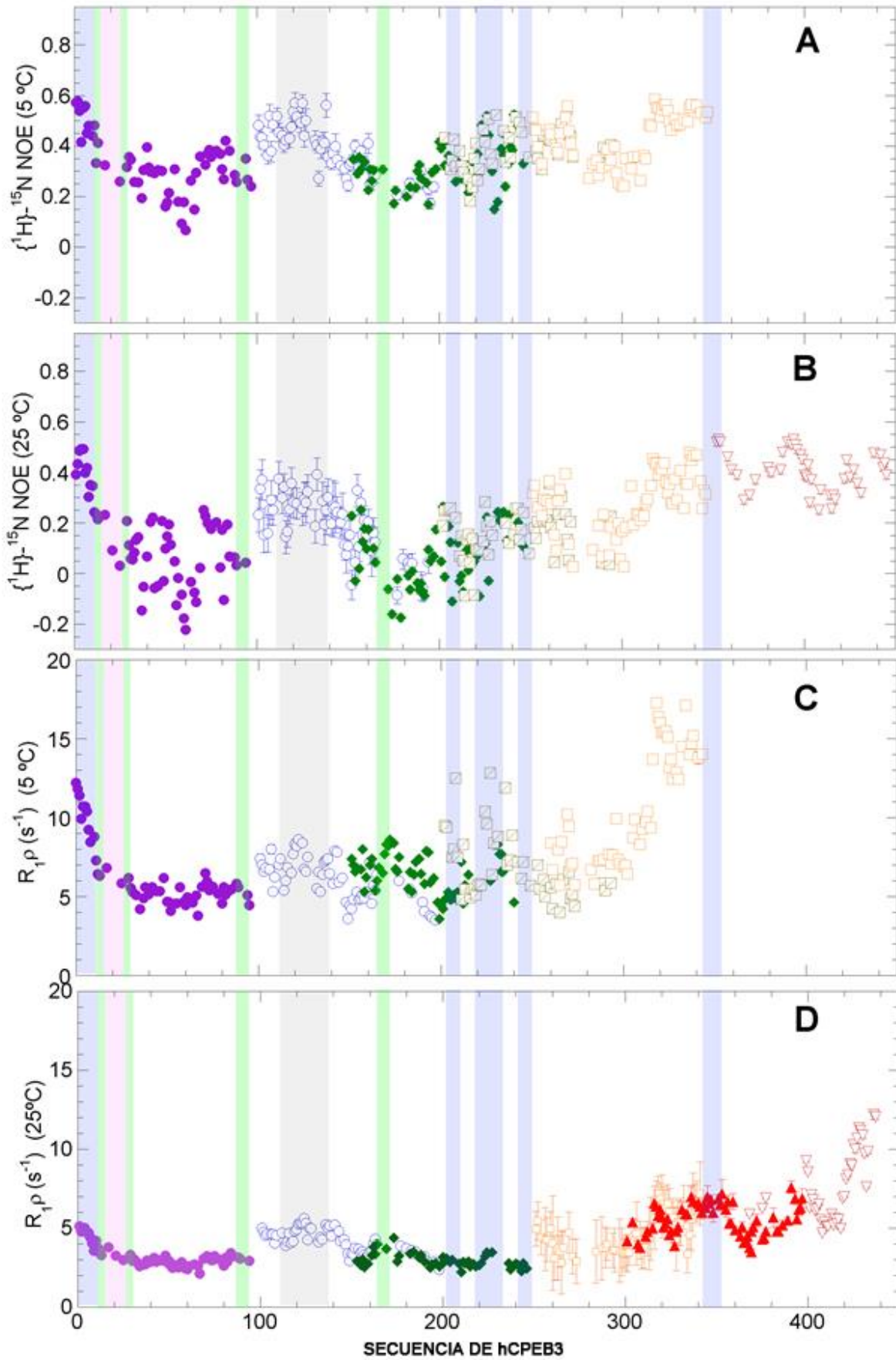
Por otra parte, el segmento 161-QHHQQPPPPAPAPQPAQPAQPPQAQPPQQ R-190 tiene un alto contenido de residuos de prolina y glutamina. Concretamente, los residuos de prolina consecutivos 166-PPPPAPAPQP-175 también mostraron un patrón de desplazamientos químicos conformacionales característico de hélice PPII (**Figura 4.8B**) como el observado para los residuos 86-93. Por ello, se propone que estos segmentos podrían unirse a la profilina, que tiene un dominio específico para unirse a los polipéptidos ricos en residuos de prolina (Metzler et al., 1994), y mediar de esta forma las interacciones con el citoesqueleto de actina que se ha demostrado que son requeridas para la agregación de CPEB3 ratón (Stephan et al., 2015).

En relación a los residuos 101-200, no se detectó ninguna tendencia a adoptar estructura de hélice  $\alpha$  o hebra  $\beta$ . Sin embargo, la zona compuesta de los residuos 111-WSTGTTNAVEDSFFQGITPVNGTMLFQNF-139 que contiene una elevada proporción de residuos aromáticos y alifáticos, mostró una rigidez relativamente alta tanto en la escala de tiempo de ps-ns como en la más lenta de  $\mu$ s-ms (**Figura 4.9**). Este descubrimiento es interesante teniendo en cuenta que este segmento es esencial para la formación de amilode de hCPEB3 *in vitro* como se muestra en la **Sección 4.2.2 (Resultados)**.

### 4.1.5. Repeticiones de alanina-serina

La desviación significativa de los desplazamientos químicos con respecto a los valores predichos para el conjunto de confórmeros desordenados que indica una elevada proporción de hélice  $\alpha$  en los tres segmentos destacados a continuación, justifica el cálculo de una familia de confórmeros para los residuos 202-AQRSAAAY GHQPIMTSKPSSSSAVAAAAAAAAAASSASSWNTHQSVHAA-250 (**Figura 4.10A**). Estos tres segmentos adoptan una estructura de hélice  $\alpha$  parcial en equilibrio con su forma desordenada. En relación a la magnitud de los desplazamientos químicos conformacionales, la proporción de hélice  $\alpha$  es diferente en cada caso siendo de ~ 30% para la hélice  $\alpha$  A202-Y210, ~ 80% para la hélice  $\alpha$  S222-A234 y ~ 20% para la hélice  $\alpha$  A238-Q246 a 5 °C. A 25 °C, estos valores disminuyeron aunque seguían siendo significativos (**Figura 4.10B**). La presencia de la primera y segunda hélices  $\alpha$  se confirmó calculando las constantes de acoplamiento  $^1\text{HN}-^1\text{H}\alpha$  (**Figura 4.11**).





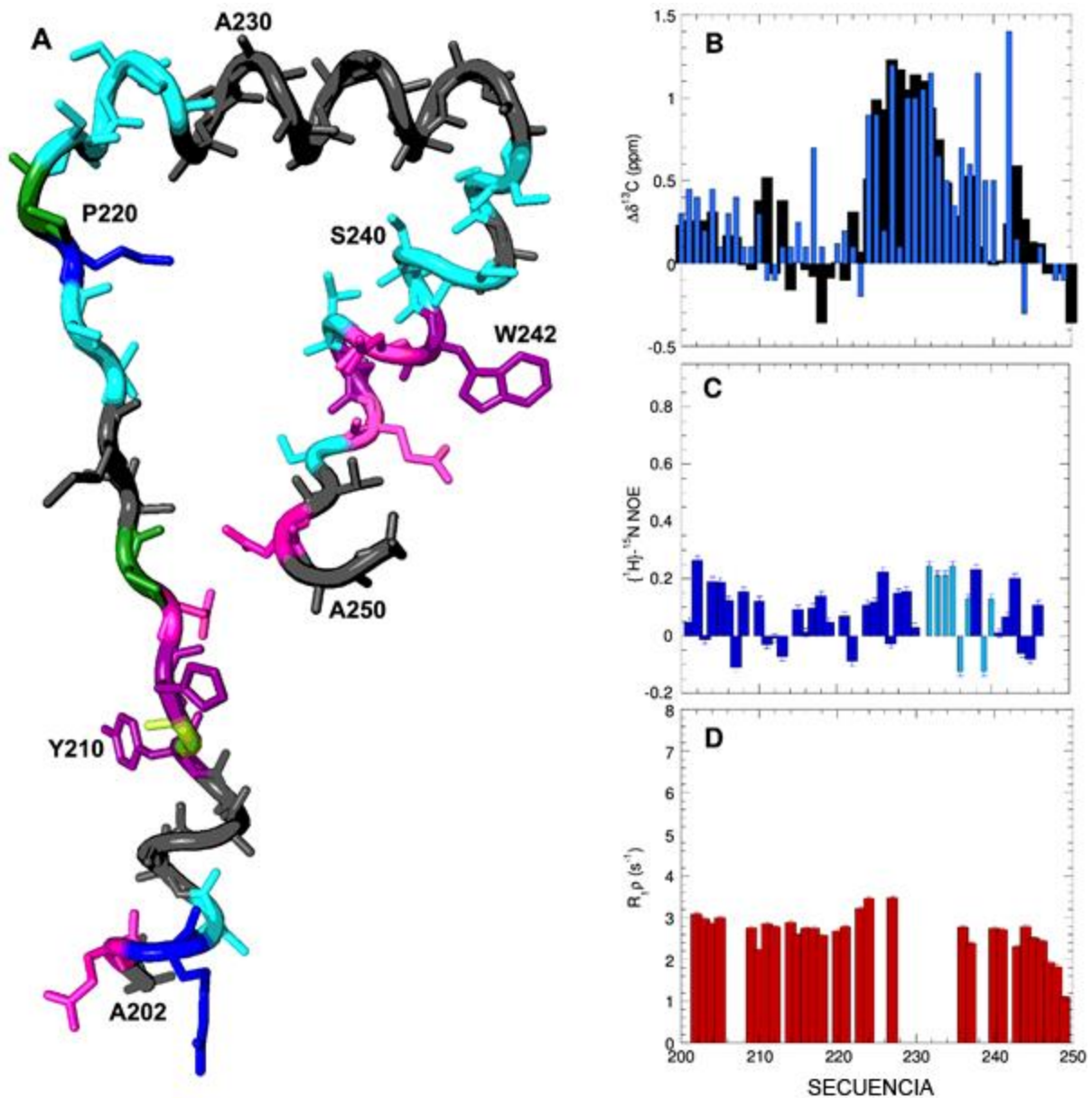
## IV, RESULTADOS

**Figura 4.9: Dinámica por residuo de la IDR de hCPEB3.** Dinámica por residuo en las escalas de tiempo de ps-ns a **(A)** 5 °C y **(B)** 25 °C y en más lenta de  $\mu$ s-ms a **(C)** 5 °C y **(D)** 25 °C. En los paneles **A** y **B**, el valor de 0,86 corresponde a los grupos H-N completamente rígidos; valores negativos son característicos de una alta flexibilidad. En los paneles **C** y **D**, los valores inferiores a  $4 \text{ s}^{-1}$  son distintivos de residuos flexibles, valores mayores se relacionan con una disminución en la movilidad. Los datos correspondientes a cada uno de los segmentos estudiados aparecen coloreados diferentemente: segmento 1 (morado), segmento 3 (azul), segmento 4 (verde), segmento 5 (marrón), segmento 6 (naranja), segmento 7 (rojo) y segmento 8 (granate). No aparecen representados los datos para los segmentos 7 y 8 a 5 °C, para el segmento 5 en el panel **D** y para el segmento 7 en el panel **B** dado que los espectros obtenidos no tenían la calidad suficiente. La falta del resto de valores se debe a solapamiento de la señal  $^1\text{H}^{15}\text{N}$  o a la falta de hidrógeno del nitrógeno de los residuos de prolina. Las barras de error representan la incertidumbre estimada de la intensidad señal/ruido para los paneles **A** y **B** y del ajuste de la función de decaimiento exponencial a la intensidad de la señal frente los datos del tiempo de retraso para los paneles **C** y **D**. Las barras de error pueden quedar ocultas por los símbolos utilizados para representar los datos. Tanto las regiones con estructura parcial como de interés aparecen sombreadas en azul para las hélices  $\alpha$  y en gris para los segmentos hidrófobos y su movilidad es menor. Por el contrario, el segmento de poliglutamina sombreado en magenta es más flexible. Si bien la dinámica de los segmentos ricos en residuos de prolina que aparecen sombreados en verde no puede ser determinada directamente dado que estos residuos de tipo iminoácido carecen de  $^1\text{HN}$ , los residuos próximos muestran una movilidad relativamente alta.

Estas hélices  $\alpha$  no son especialmente rígidas en la escala de tiempo de ps-ns (**Figura 4.10C**) ni en la más lenta de  $\mu$ s-ms (**Figura 4.10D**) a 25 °C pero muestran una rigidez elevada a 5 °C (**Figura 4.9**). La proyección en rueda helicoidal de sus residuos (**Figura 4.12**) sugiere que diferentes interacciones contribuyen a la estabilización de las hélices  $\alpha$ .

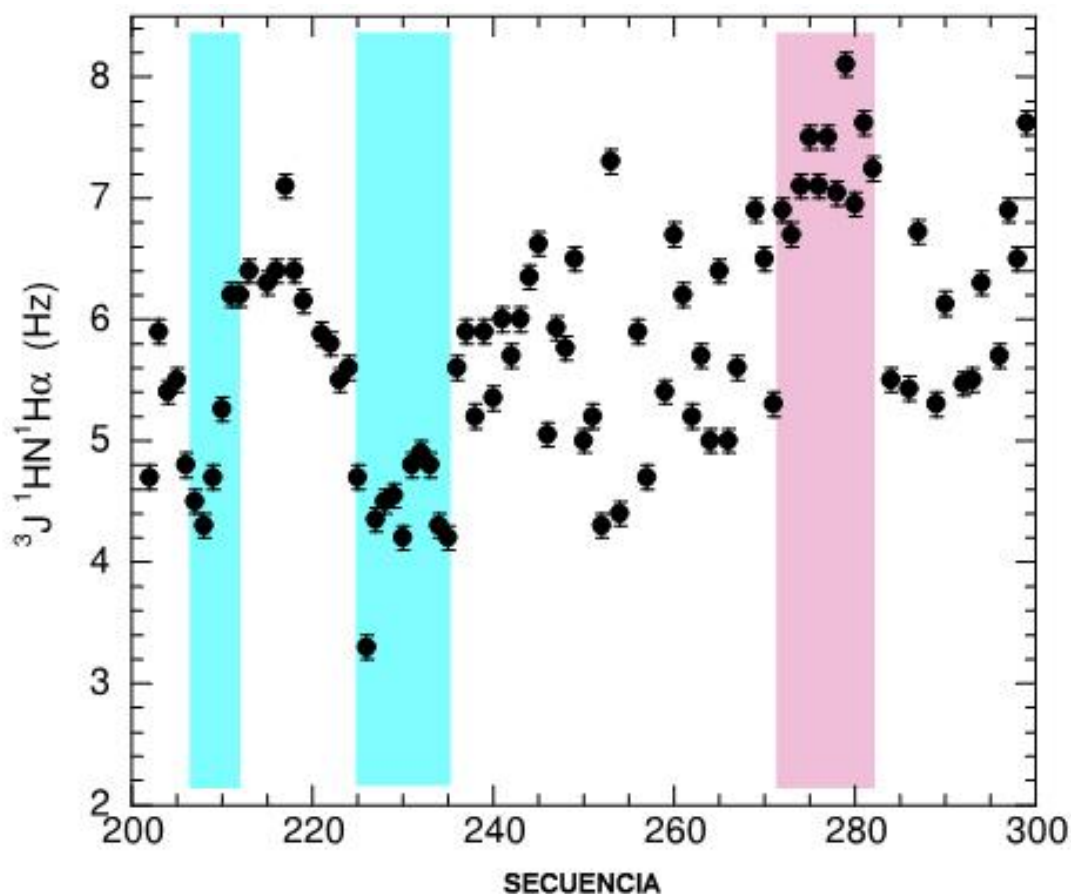
Así pues, los residuos de G211 e H212 están posicionados de forma que pueden estabilizar la hélice  $\alpha$  A202-Y210 formando un motivo de caperuza C (Aurora and Rose, 1998). Cabe destacar que los residuos de alanina tienen una alta tendencia intrínseca a adoptar una estructura de hélice  $\alpha$  en comparación con la propensión de los residuos de serina que es baja (Chakrabarty et al., 1994). En este segmento, sin embargo, los residuos de serina están posicionados en el extremo N-terminal de las hélices  $\alpha$ , donde la adición de carga negativa mediante fosforilación produciría un incremento en la proporción de hélice  $\alpha$  si se tiene en cuenta los efectos estabilizantes de las interacciones carga-macro dipolo y los enlaces de hidrógeno del motivo de caperuza N (Chakrabarty and Baldwin, 1995). La última hélice  $\alpha$  es la menos estable, sin embargo su estabilidad puede verse incrementada si el residuo de W242 participase en interacciones de largo alcance.





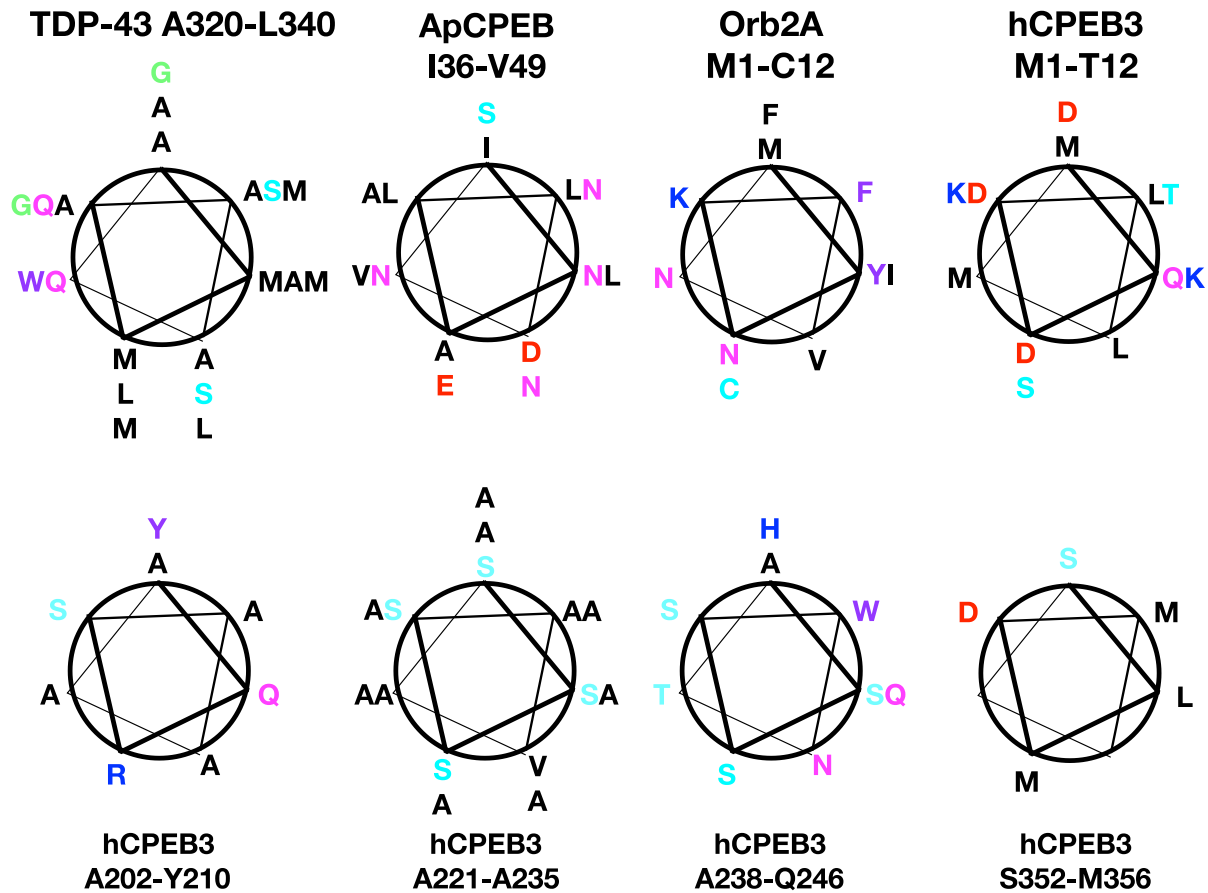
**Figura 4.10: Hélices  $\alpha$  parciales de los residuos 201-250.** (A) Confórmero representativo de los residuos 201-250 que muestra las tres hélices  $\alpha$ . Los residuos no polares están representados en negro, los aromáticos en violeta, Q/N en magenta, E/D en rojo, K/R en azul, glicina en verde y C/S/T en cian. (B) Desplazamientos químicos conformacionales  $^{13}\text{CO}$  (barras en negro) y  $^{13}\text{Ca}$  (barras en azul) de los residuos 201-250 a 25 °C. Nótese que la segunda hélice  $\alpha$  que contiene 9 residuos de alanina consecutivos tiene una proporción relativamente alta de estructura en forma de hélice  $\alpha$ . La incertidumbre estimada en los desplazamientos químicos conformacionales es de 0,02 y 0,1 ppm para  $^{13}\text{CO}$  y  $^{13}\text{Ca}$  respectivamente. (C) Los valores  $\{^1\text{H}\}\text{-}^{15}\text{N}$  NOE en la escala de tiempo de ps-ns se muestran en azul oscuro para cada resonancia  $^1\text{H}^{15}\text{N}$ . Los valores correspondientes a las señales solapadas se muestran en azul claro. (D) Se muestran los valores  $R_{1\rho}$  en la escala de tiempo de  $\mu\text{s}$ -ms. Los valores  $\{^1\text{H}\}\text{-}^{15}\text{N}$  NOE y  $R_{1\rho}$  fueron significativamente mayores para las medidas de relajación observadas a 5 °C (Figura 4.9).

#### IV, RESULTADOS



**Figura 4.11: Valores de las constantes de acoplamiento  $^1HN-^1H\alpha$  para el segmento 5.** Constantes de acoplamiento ( $^3J_{1HN1H\alpha}$ ) de tres enlaces  $^1HN-^1H\alpha$  intraresiduo para el segmento 5 de hCPEB3. Las regiones con  $^3J_{1HN1H\alpha} < 5$  (cian) corresponden a dos hélices  $\alpha$  de acuerdo con los resultados basados en las desviaciones de los desplazamientos químicos. La zona con  $^3J_{1HN1H\alpha} > 7$  (magenta) es característico de conformaciones extendidas. Esta zona se corresponde con el motivo (VG)<sub>5</sub>.

Una de las zonas más peculiares de la secuencia de hCPEB3 es la del motivo dipéptido valina-glicina de los residuos 271-281, que es reminiscente de otras proteínas con un mayor número de repeticiones de los dipéptidos alanina-glicina, prolina-glicina y arginina-glicina como las que codifica el mutante C9orf72 implicado en ELA (Mizielinska et al., 2014; Morón-Oset et al., 2019). El análisis realizado mediante métodos bioinformáticos permitió identificar que este segmento tiene tendencia tanto a la separación de fases como a la formación de amiloide, como recoge la **Sección 4.2.1 (Resultados)**. En este sentido, el estudio por RMN revela que este segmento es de las zonas más desordenadas y flexibles de la proteína. Cabe especular que estos residuos expuestos de valina podrían ser también requeridos para interactuar mediante la formación de interacciones hidrófobas con otros factores que todavía no han sido identificados.

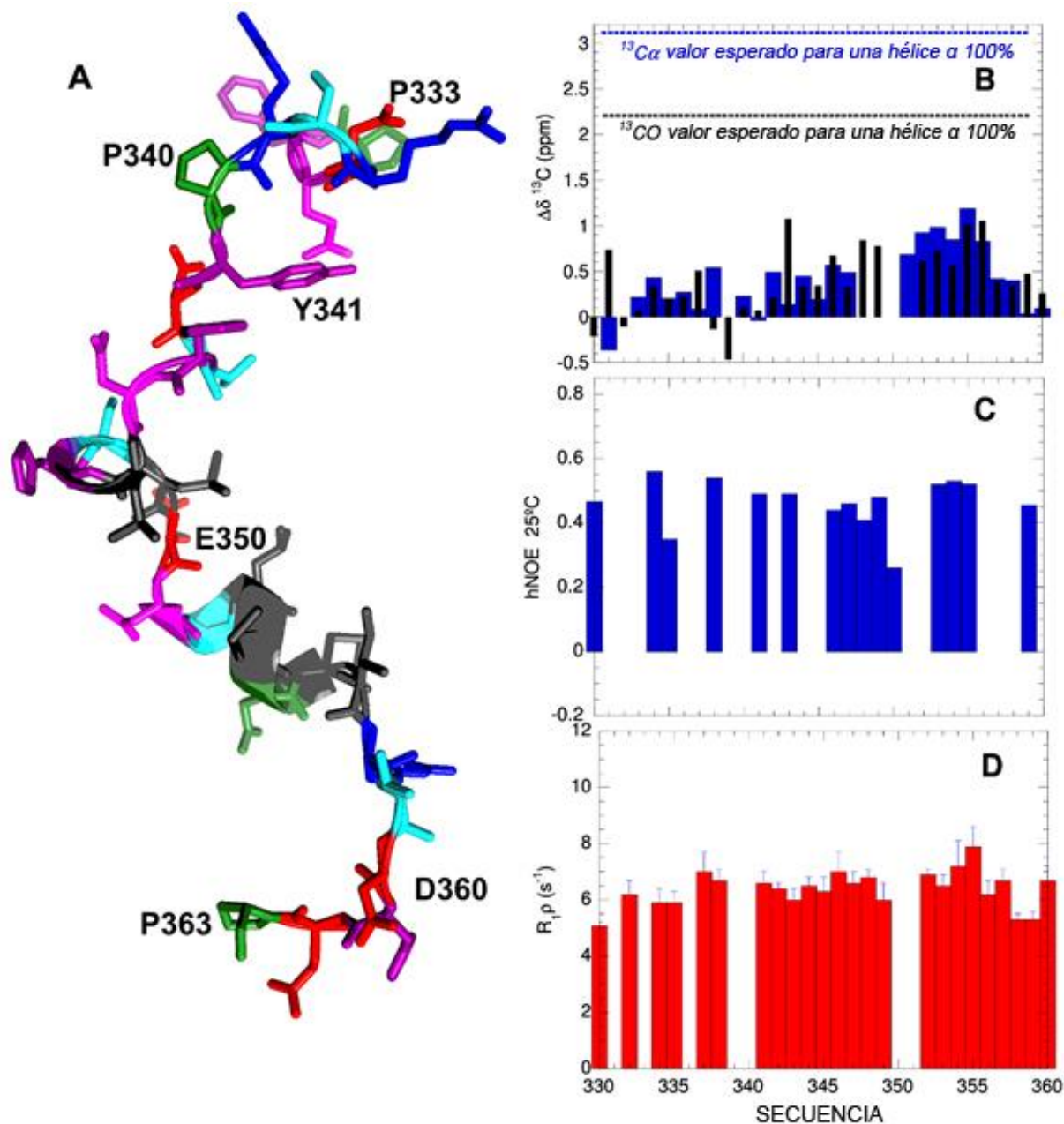


**Figura 4.12: Estabilización de las hélices  $\alpha$  en amiloides funcionales y patológicos.** Proyecciones en rueda helicoidal de TDP-43, ApCPEB, Orb2A y hCPEB3. Los residuos no polares están coloreados en negro, los aromáticos en morado, Q/N en magenta, D/E en rojo, H/K/R en azul, glicina en verde y C/S/T en cian. Las 5 hélices  $\alpha$  de hCPEB3 y la hélice  $\alpha$  de Orb2A han sido identificadas a partir de datos de RMN, esta última en presencia de vesículas lipídicas (Cervantes et al., 2016; Soria et al., 2017). La hélice  $\alpha$  de TDP-43 fue identificada por Liangzhong Lim *et al.* (Lim et al., 2016). La hélice  $\alpha$  de ApCPEB no ha sido confirmada experimentalmente.

A continuación del motivo dipéptido (VG)<sub>5</sub>, existe una zona de 15 residuos 284-PLNPISPLKKPFSS-298, cuyos parámetros de RMN indican que está desordenada y es flexible (**Figura 4.9**). Esta zona contiene cuatro residuos de serina que son fosforilados por la proteína quinasa A y la quinasa Ca<sup>2+</sup>/calmodulina proteína quinasa II durante la activación sináptica (Kaczmarczyk et al., 2016), por ello parecen resultar importantes para la transición entre la memoria a corto y largo plazo. Por otra parte, los residuos 303-PPKFPRAAP-311 son ricos en residuos de prolina y la R308 aparece metilada en mCPEB3 (Guo et al., 2014). Se ha demostrado que este tipo de modificación post-traducciona puede regular la LLPS debilitando las interacciones

## IV, RESULTADOS

cación- $\pi$ , desestabiliza los condensados biomoleculares de otras proteínas y reduce las interacciones con el ARN (Chong et al., 2018).



**Figura 4.13: Hélice  $\alpha$  parcial de la NES y fosforilación putativa del residuo Y341. (A)** Confórmero representativo del segmento 333-PFQDRSRPYDTFNLHSLMDMIRTDHEP-363. Los residuos no polares están representados en negro, los aromáticos en morado, Q/N en magenta, E/D en rojo, K/R en azul, prolina en verde y S/T en cian. Las dos hélices  $\alpha$  formadas por los residuos 346-349 y 352-356 aparecen representadas mediante cinta en espiral **(B)** Identificación de la preferencia estructural en forma de hélice  $\alpha$  mediante los desplazamientos químicos conformacionales  $^{13}\text{CO}$  (barras en negro) y  $^{13}\text{C}\alpha$  (barras en azul). **(C)** Los valores  $\{^1\text{H}\}$ - $^{15}\text{N}$  NOE de 0,85 y -0,20 indican una alta rigidez y flexibilidad respectivamente en la escala de tiempo de ps-ns **(D)** Valores  $R_{1\rho}$  más altos son característicos de estructuras rígidas en escala de tiempo de  $\mu\text{s}$ -ms.

#### 4.1.6. Señal de exportación nuclear

El segmento constituido por los residuos P333-P363 es rico en residuos aromáticos e hidrófobos siendo inusual para un polipéptido desordenado. Se observaron desplazamientos químicos conformacionales significativos para los residuos L349-L353 que forman la NES y que indican la presencia de estructura en forma de hélice  $\alpha$ . Por ello, se calcularon una familia de confórmeros para los residuos P333-P363 usando los desplazamientos químicos  $^{13}\text{CO}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{HN}$ ,  $^{13}\text{C}\alpha$  y  $^{13}\text{C}\beta$ . Las estructuras resultantes revelan que los residuos L346-L349 forman un giro de hélice  $\alpha$  y los residuos S<sub>352</sub>-M<sub>356</sub> una hélice  $\alpha$  más corta (**Figura 4.13A**). La familia de confórmeros calculada muestra una gran similitud estructural en la región helicoidal, residuos 346-356, con una RMSD de 0,9 Å para el esqueleto de la cadena polipeptídica y de 1,6 Å para los átomos pesados. Los valores de los desplazamientos químicos conformacionales mostrados en la **Figura 4.13B** indican que la proporción de hélice  $\alpha$  es aproximadamente un tercio. La presencia de confórmeros rígidos se corrobora con los valores  $\{^1\text{H}\}$ - $^{15}\text{N}$  NOE (**Figura 4.13C**) y de relajación transversa (**Figura 4.13D**) relativamente altos. Además, los cinco residuos apolares en este confórmero (L346, L349, L353, M354 e I357) están posicionados del mismo lado en la hélice  $\alpha$ . Por su parte, el sitio de fosforilación putativo Y341 está en una zona extendida de la cadena polipeptídica y, por tanto, accesible para poder ser modificado.

A continuación de la hélice  $\alpha$  de la NES no se detecta ninguna zona con estructura secundaria preferente si bien la región presenta un elevado contenido de residuos hidrófobos y tienden a ser más rígidos (**Figura 4.9**) Los últimos residuos del segmento 8 (residuos 352-450) que son 426-SRKVFVGGLPPDIDEDEITASFRRF-450 pertenecen al dominio RRM1. Según la estructura 3D (Tsuda et al., 2014), los residuos K428-G432 adoptan una estructura de hebra  $\beta$  y los residuos E428-R449 forman una hélice  $\alpha$  en el contexto del dominio plegado RRM1. Sin embargo, en el segmento 8 dichos residuos están desordenados.

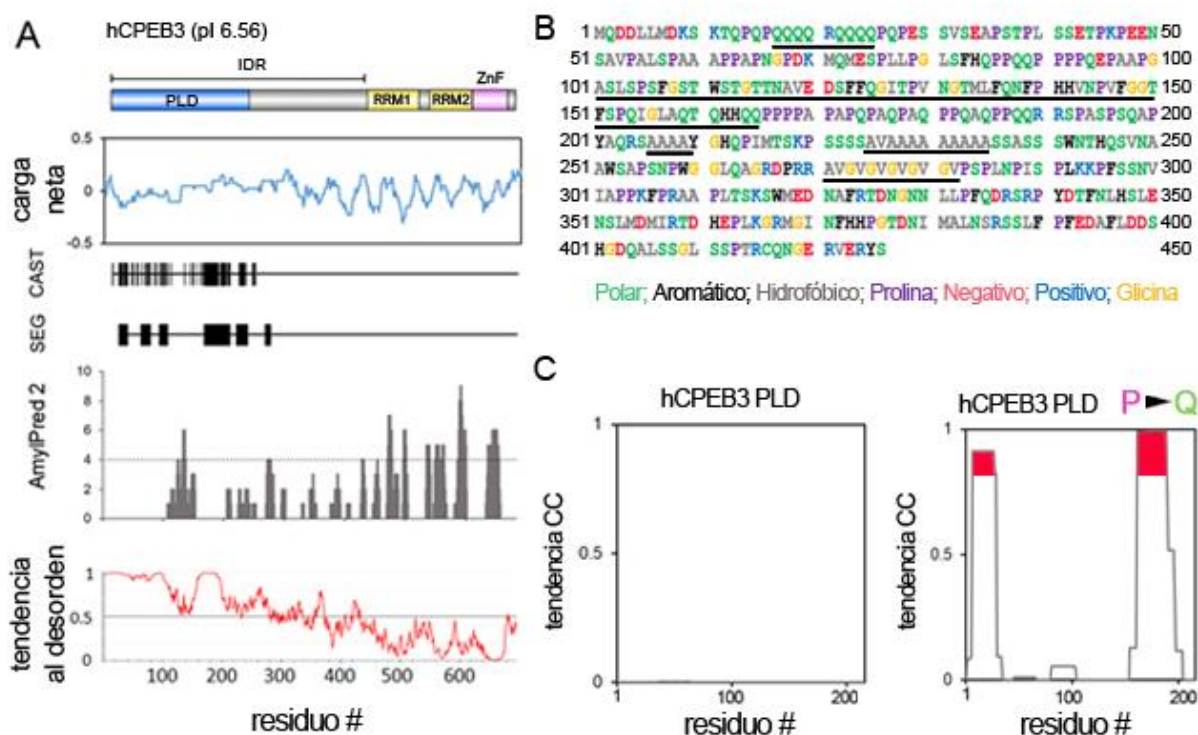
## IV, RESULTADOS



## 4.2. Separación y transición de fases de hCPEB3

### 4.2.1. Análisis bioinformático de la secuencia

El análisis bioinformático de la secuencia de hCPEB3 realizado mediante la herramienta EMBOSS Charge y el algoritmo IUPred (Dosztányi et al., 2005) predijo que la IDR presenta una baja carga neta por residuo y una gran tendencia a adoptar una conformación desordenada (**Figura 4.14A**). Estos resultados están de acuerdo con los datos obtenidos por RMN que se muestran en la **Sección 4.1 (Resultados)**.

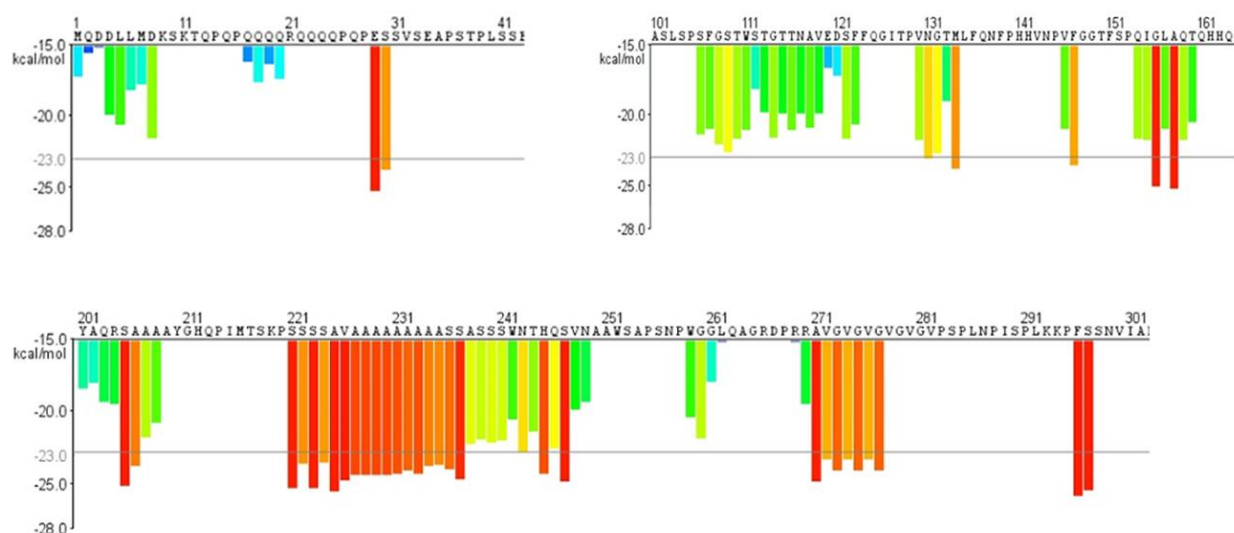


**Figura 4.14: Análisis bioinformático de la secuencia de hCPEB3.** (A) Representación esquemática de la proteína hCPEB3 que muestra la localización del PLD (azul), los RRM1 y RRM2 (amarillo) y el motivo ZnF (rosa). Los resultados de los algoritmos SEG y CAST indican diferentes segmentos cortos de baja complejidad localizados en la región N-terminal. Se muestra el perfil de propensión a la fibrilación de hCPEB3 obtenido con la herramienta AmylPred 2 (la línea discontinua indica el número mínimo de programas con consenso para que un residuo sea considerado amiloidogénico). La tendencia al desorden fue predicha mediante el algoritmo IUPred. La posición de cada residuo de la secuencia de hCPEB3 está representada en el eje x. (B) La secuencia de la IDR de hCPEB3 se muestra con los residuos polares, aromáticos, hidrófobos, de prolina, con carga negativa, con carga positiva y de glicina coloreados en verde, negro, gris, magenta, rojo, azul y amarillo respectivamente. (C) Tendencia a nivel de residuo de la secuencia del PLD de hCPEB3 y de la secuencia con los residuos de prolina sustituidos por glutamina, a la formación de hélices superenrolladas (CC) calculada con el algoritmo COILS. Las zonas con máxima propensión (0,8-1) aparecen resaltadas en rojo.

## IV, RESULTADOS

Además, el análisis con el algoritmo PLAAC (Lancaster et al., 2014) permitió identificar los residuos 13-28 y 147-214 como secuencias priónicas. Estos dos segmentos forman parte de una LCR identificada con los algoritmos SEG y CAST (Kirmitzoglou and Promponas, 2015) cuya composición es de 18% prolina, 13% alanina, 13% serina y 12% glutamina. Estos residuos están distribuidos en repeticiones en tándem imperfectas de prolina, alanina y glutamina y en repeticiones de serina y alanina (**Figura 4.14B**).

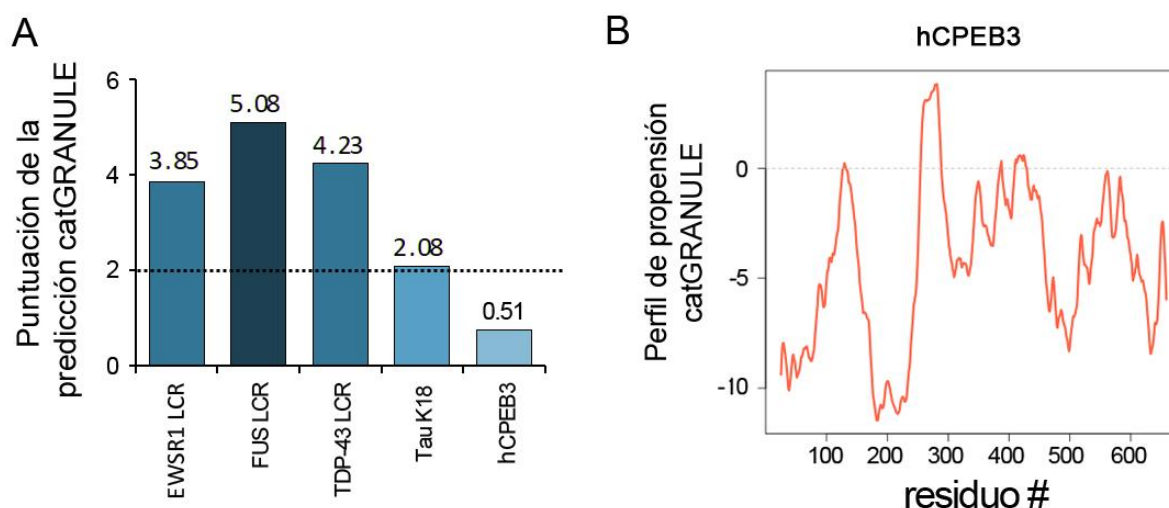
Mediante un análisis por sustitución de prolina por glutamina y usando el algoritmo COILS (Lupas et al., 1991), se identificó una tendencia intrínseca de estas secuencias a formar hélices superenrolladas que aumenta notablemente con la sustitución por glutamina (**Figura 4.14C**). La secuencia de hCPBE3 también presenta dos zonas que son propensas a formar amiloide según la predicción computacional del algoritmo AmylPred 2 (Tsolis et al., 2013). Particularmente, la región con mayor tendencia incluye los residuos 107-152 de la LCR. Estos datos concuerdan con los segmentos capaces de formar fibras de amiloide predichos por el algoritmo ZipperDB (**Figura 4.15**) (Thompson et al., 2006).



**Figura 4.15: Predicciones de la tendencia del PLD de hCPBE3 a la formación de cremalleras estéricas de amiloide.** Cada residuo de la secuencia de hCPBE3 aparece coloreado de acuerdo a la propensión a formación de fibras de amiloide en una escala arco iris de azul (baja) a rojo (alta). El valor experimental de la energía Rosetta umbral < -23 kcal/mol para dos hebras  $\beta$  (2 x 6 residuos) correspondiente a la formación de amiloide.



Con el objetivo de investigar si hCPEB3 tiene la habilidad de separarse de fase, la secuencia fue analizada con el algoritmo catGRANULE (Mitchell et al., 2013). A pesar de que la tendencia general a la LLPS es baja con una puntuación de 0,51 por debajo de los valores de proteínas para que las que se ha comprobado experimentalmente que forman condensados biomoleculares (**Figura 4.16A**) (Ambadipudi et al., 2017), ciertos segmentos, en particular los residuos 254-288, muestran una gran tendencia a la condensación (**Figura 4.16B**).



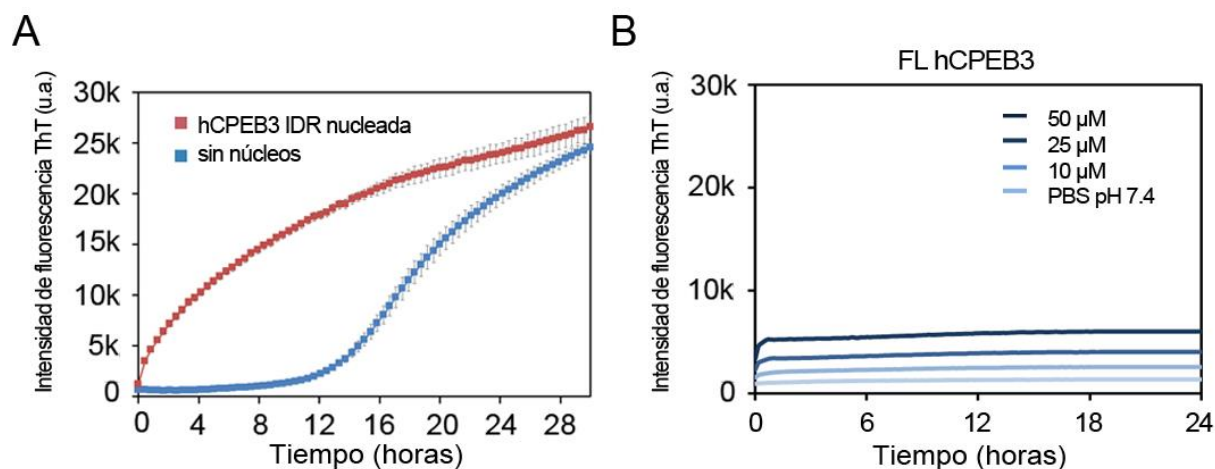
**Figura 4.16: Predicción de la tendencia de hCPEB3 a formar condensados biomoleculares. (A)** Puntuación total del algoritmo catGRANULE para diferentes proteínas cuya capacidad para separarse de fase ha sido comprobada experimentalmente. El valor umbral se ha determinado utilizando la puntuación de proteínas que experimentalmente forman condensados biomoleculares. **(B)** Tendencia específica por residuo de la secuencia de hCPEB3 a la formación de gránulos calculada con catGRANULE. Los valores -10 y 10 indican una baja y alta tendencia a la formación de condensados biomoleculares respectivamente.

#### 4.2.2. Propiedades estructurales *in vitro*

Para comprobar experimentalmente el comportamiento amiloidogénico de hCPEB3, se realizó un análisis de la tendencia a la agregación de las regiones y segmentos indicados en la **Tablas 8.1.1, 8.1.2 y 8.1.3** y que cubren la IDR en su totalidad. Los resultados obtenidos mostraron que la IDR de hCPEB3 adopta un estado amiloide capaz de transmitir su conformación eficientemente según se observa en el ensayo de unión de ThT (**Figura 4.17A**). Por el contrario, la FL de hCPEB3 tiene una capacidad para unirse a ThT baja (**Figura 4.17B**) formando agregados amorfo

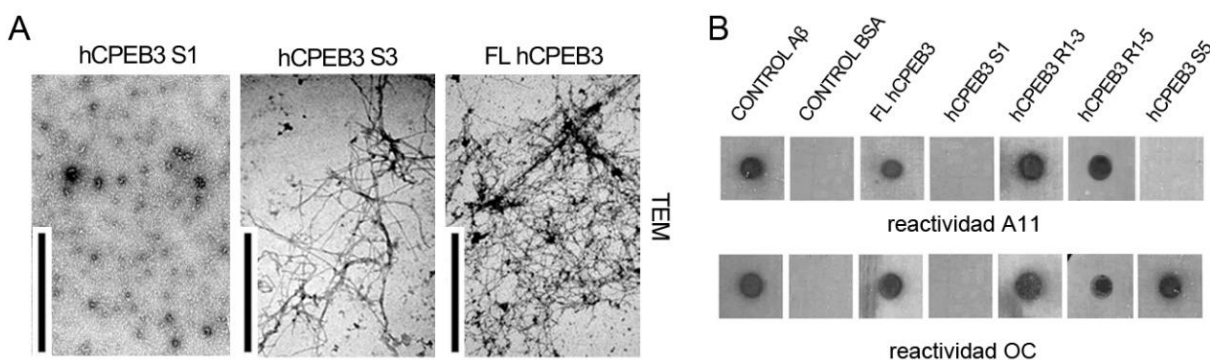
## IV, RESULTADOS

con escasa presencia de fibras de amiloide en condiciones fisiológicas (**Figura 4.18A**).



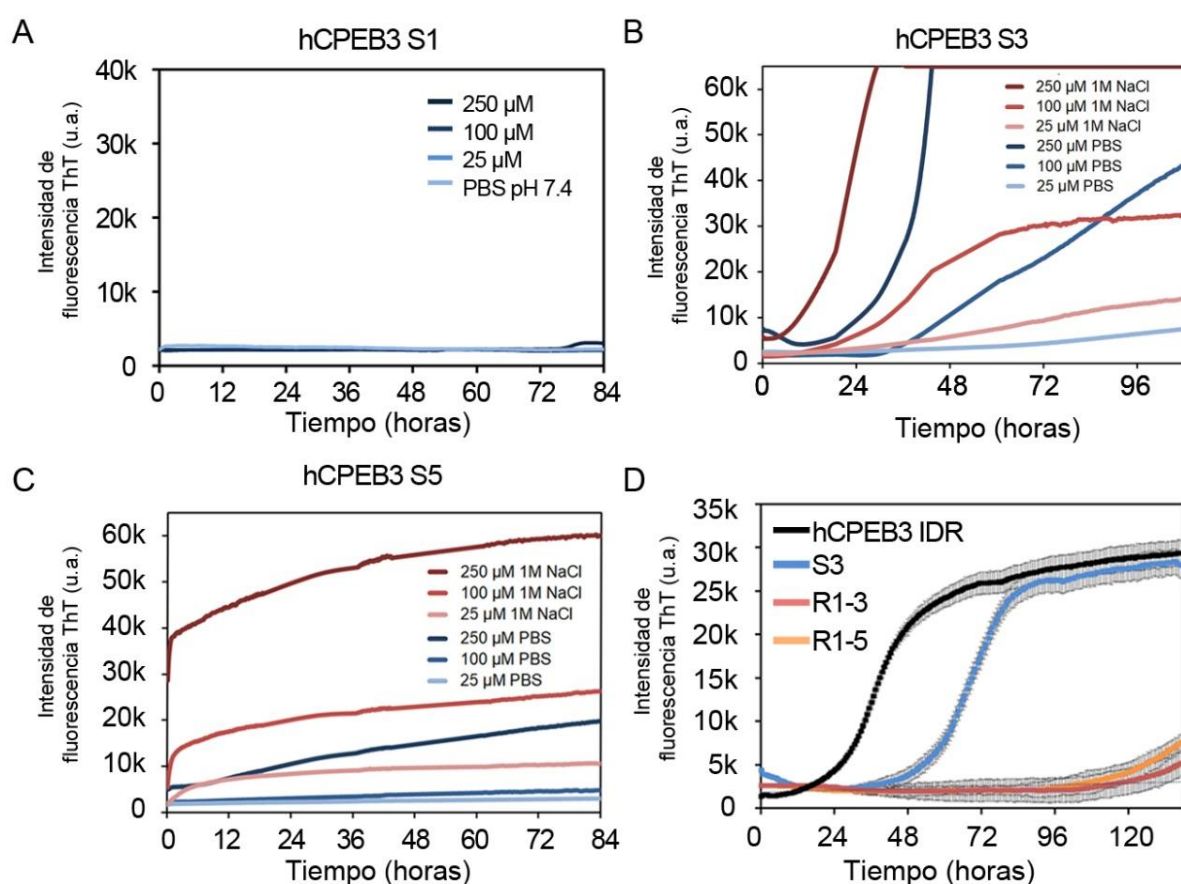
**Figura 4.17: Cinéticas de formación de amiloide de la IDR y la FL de hCPEB3.** **(A)** Cinética de la fibrilación de la IDR de hCPEB3 soluble en ausencia (azul) o en presencia del 20% de núcleos preformados de amiloide (rojo) medida por fluorescencia ThT. Las barras de error indican el error estándar de la media SEM ( $n = 3$ ). **(B)** Cinética de fibrilación determinada por fluorescencia de emisión ThT de la FL de hCPEB3 a la concentración indicada en el panel.

Concretamente, el segmento 1, que contiene la zona poliglutamina Q<sub>4</sub>RQ<sub>4</sub>, adopta un estado oligomérico (**Figura 4.18A**) que no es reconocido por el anticuerpo conformacional A11 (que detecta oligómeros prefibrilares) ni por el anticuerpo OC (que detecta oligómeros fibrilares y fibras de amiloide) (**Figura 4.18B**) y no muestra capacidad de unión a ThT (**Figura 4.19A**). Estos resultados indican que la zona Q<sub>4</sub>RQ<sub>4</sub> no es suficiente para la formación de amiloide.



**Figura 4.18: Características estructurales de las regiones y los segmentos amiloidogénicos de hCPEB3.** **(A)** Micrografía de TEM representativa de las fibras de amiloide de hCPEB3 (barra de escala: 2  $\mu\text{m}$ ), oligómeros de CPEB3 S1 (residuos 1-100) (barra de escala: 1  $\mu\text{m}$ ) y fibras de amiloide de CPEB3 S3 (residuos 101-200) (barra de escala: 200 nm). **(B)** El *immunodot blot* muestra las regiones y los segmentos de hCPEB3 indicados que son reconocidos por los anticuerpos A11 y OC.

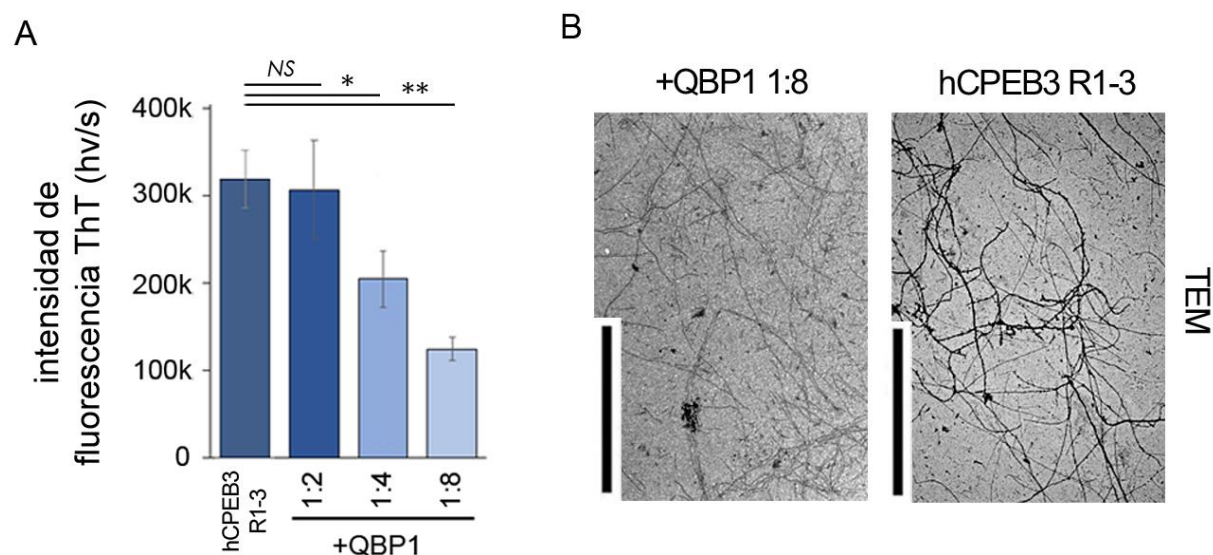
El segmento 3 muestra un comportamiento con tendencia amiloidogénica formando fibras de amiloide no ramificados (**Figura 4.18A**) y sus agregados también exhiben cinéticas de unión a ThT propias de las proteínas que forman fibras de amiloide (**Figura 4.19B**). Estos datos concuerdan con las predicciones obtenidas con los algoritmos AmylPred 2 y ZipperDB. Considerando que los residuos de prolina son excluidos de la estructura secundaria en forma de hebra  $\beta$  y que su presencia previene la formación de amiloide (Kraus, 2016; Moriarty and Raleigh, 1999; Thakur et al., 2004), se concluye que los residuos 106-165 son esenciales para la formación de amiloide de hCPEB3. En relación a las regiones R1-3 (residuos 1-200) y R1-5 (residuos 1-300), que contienen los segmentos 1 y 3, ambas muestran reactividad A11 y OC (**Figura 4.18B**), y su forma agregada presenta capacidad de unión a ThT (**Figura 4.19D**).



**Figura 4.19: Cinéticas de formación de amiloide de las regiones y los segmentos de hCPEB3.** (A) Cinética de fibrilación determinada por fluorescencia de emisión ThT del segmento S1 (residuos 1-100) a la concentración indicada en el panel. (B) Cinética fluorescencia ThT que muestra el efecto de la fuerza iónica sobre las cinéticas de fibrilación del segmento S3 (residuos 101-200) y del (C) segmento S5 (residuos 202-300). (D) Cinética de fluorescencia ThT durante la fibrilación amiloide de la IDR de hCPEB3, El segmento S3 y las dos regiones indicadas en el panel. Cada punto representa la media de tres réplicas y las barras de error indican el SEM.

## IV, RESULTADOS

El segmento 5 (residuos 202-300), que incluye el motivo de polialanina muestra una elevada tendencia a agregar formando fibras de amiloide (**Figura 4.20A**) que son reconocidas por el anticuerpo OC, pero no por el A11 (**Figura 4.18B**) y no muestra una unión a ThT significativa en condiciones fisiológicas (**Figura 4.19C**).

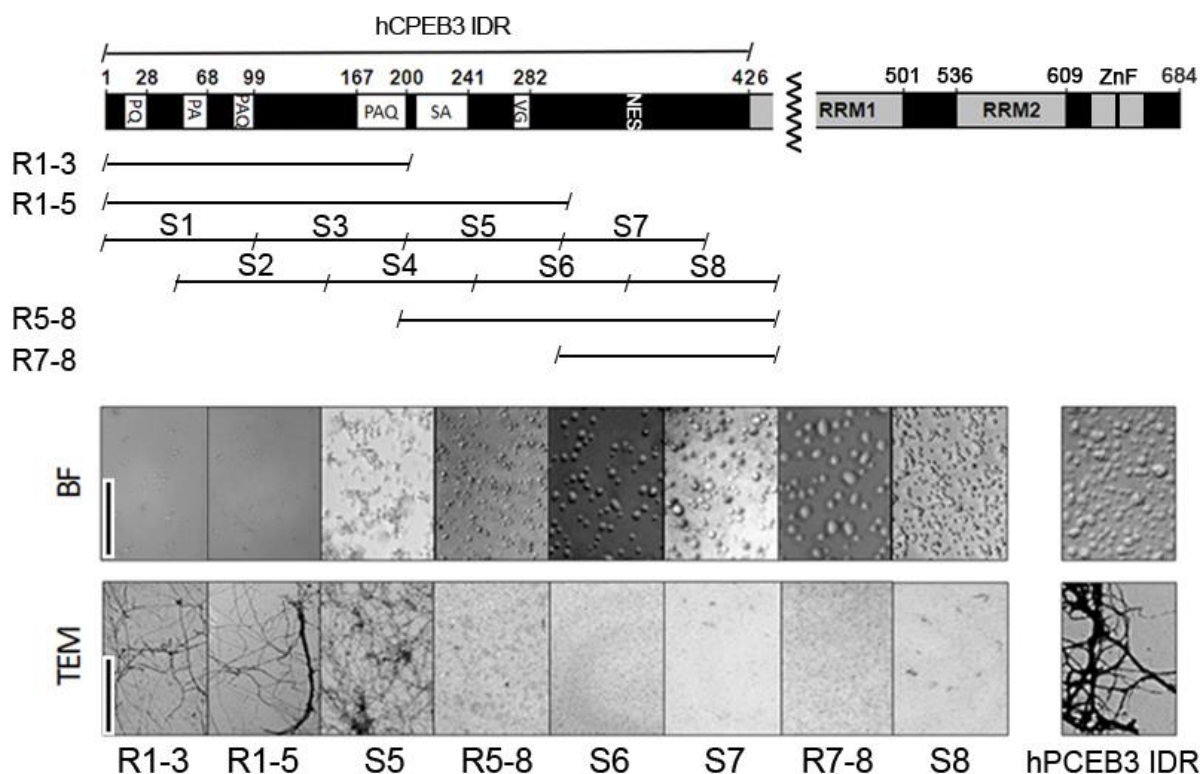


**Figura 4.20: Efecto inhibitor del péptido anti-amiloidogénico QBP1.** (A) Valores de la emisión de fluorescencia ThT de la región R1-3 (residuos 1-200) de hCPEB3 incubado en ausencia o en presencia de concentraciones crecientes de QBP1. Las barras de error indican el SEM de tres experimentos independientes. Los valores  $P$  se determinaron usando el test de la  $t$  de Student: NS, diferencia no significativa; \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ . (B) Imágenes de TEM representativas de la región R1-3 en ausencia o en presencia de QBP1 en la proporción molar hCPEB3:QBP1 1:8 (barra de escala: 200 nm).

Po otra parte, se ha demostrado que el péptido anti-amiloidogénico bloquea la formación de amiloide de diferentes proteínas asociadas con patologías como las expansiones de poliglutamina (Hervás et al., 2012; Nagai et al., 2007) y el segmento rico en residuos de glutamina y asparagina de TDP-43 (Mompeán et al., 2019), así como la de los amiloides funcionales Sup35 (Hervás et al., 2012) y los homólogos de hCPEB3 en *Aplysia* (*ApCPEB*) (Hervás et al., 2020b) y *D. melanogaster* (*Orb2*) (Hervás et al., 2016). Sin embargo, QBP1 no afecta a la formación de fibras de amiloide de tipo hidrófobo como las de  $A\beta_{42}$  (Hervás et al., 2016), lo que sugiere diferencias en los mecanismos moleculares de agregación entre ambos tipos de amiloide. En este caso QBP1 reduce la formación de amiloide de la región R1-3 de hCPEB3 de forma dependiente de la dosis de inhibidor según demuestran los resultados de fluorescencia ThT (**Figura 4.20A**) y TEM (**Figura 4.20B**). Estas



observaciones sugieren que QBP1 previene la agregación del PLD. El hecho de que QBP1 fuese desarrollado para prevenir la agregación de poliglutamina sugiere que la zona Q<sub>4</sub>RQ<sub>4</sub> localizada en el extremo N-terminal de hCPEB3 es esencial para la formación de amiloide.

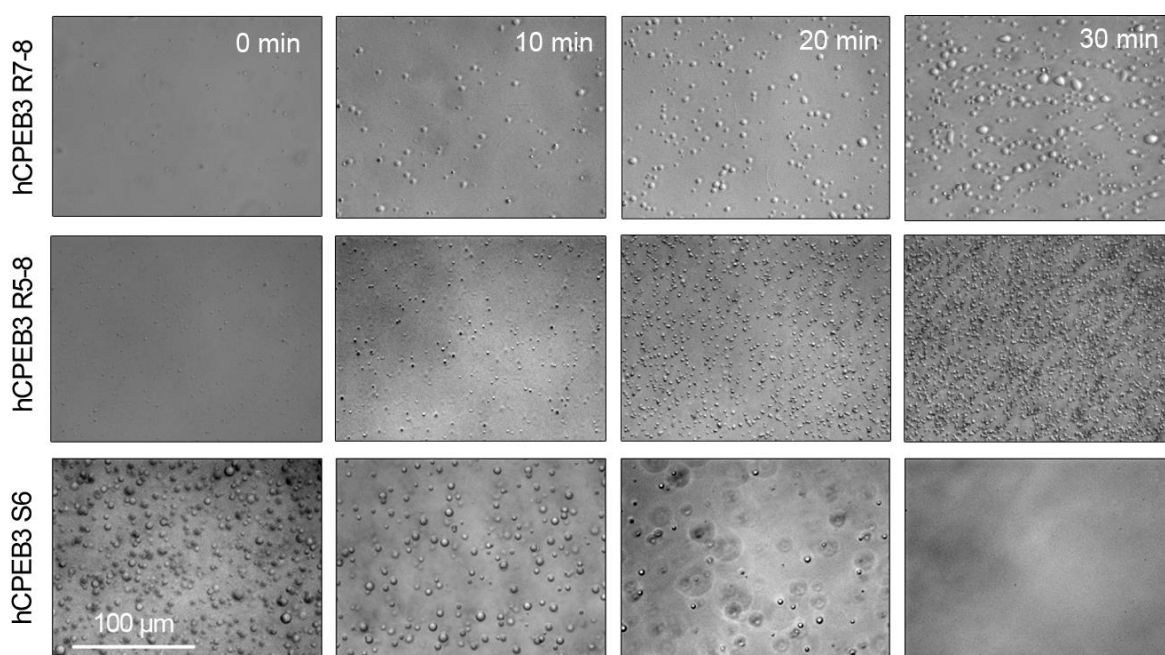


**Figura 4.21: Identificación de las secuencias de hCPEB3 con tendencia a la LLPS mediante análisis por delección secuencial.** Arquitectura de los dominios de hCPEB3 y representación esquemática de los segmentos (de S1 a S8) y regiones utilizados en este estudio. Micrografías de campo claro (paneles superiores) y electrónicas (paneles inferiores) representativas muestran la formación de condensados líquidos y amiloide de los diferentes regiones y segmentos de hCPEB3 estudiados. (Barras de escala: 100 μm y 200 nm respectivamente).

A continuación, se identificaron las secuencias de la IDR que median la LLPS. Algunos trabajos previos sobre proteínas de unión a ARN han demostrado que la separación de fases son mediadas por LCRs (Aguzzi and Altmeyer, 2016; Han et al., 2012; Molliex et al., 2015). Sin embargo, se ha observado recientemente que las LCRs ricas en residuos de prolina de proteínas como tau, Pub1 y Pab1 no son indispensables para su condensación, aunque sí son capaces de modular la LLPS (Ambadipudi et al., 2017; Franzmann and Alberti, 2019; Riback et al., 2017). Para hCPEB3, ni la delección de la región R1-3 rica en residuos de prolina ni la de la región

## IV, RESULTADOS

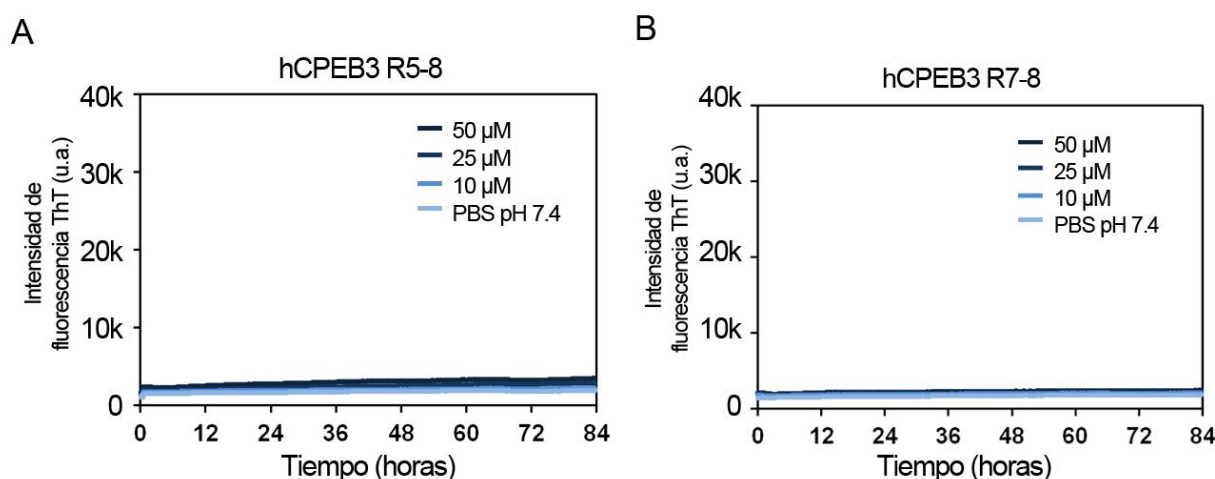
R1-5 que incluye la zona de polialanina, esto es, la delección de la LCR que contiene los elementos para la formación de amiloide, afectan a la capacidad para separarse de fase de las regiones R5-8 (residuos 202-450) y R7-8 (residuos 302-450) de hCPEB3 (**Figuras 4.21**). En particular, la región R5-8 adoptó una disposición de cúmulo o racimo en forma de red de condensados separados de fase que cesan de aumentar su tamaño por coalescencia en comparación con el resto de regiones y segmentos capaces de separarse de fase (**Figura 4.22**).



**Figura 4.22: Dinámica de los condensados líquidos que forman las secuencias de hCPEB3.** Imágenes representativas de campo claro de las regiones R7-8 (residuos 202-450) y R5-8 (residuos 302-450) de hCPEB3, y del segmento S6 (residuos 251-350) que muestran la formación y disolución de condensados líquidos respectivamente a 25 °C. [hCPEB3 S6]; [hCPEB3 R7-8]; [hCPEB3 R5-8] = 50  $\mu$ M.

Todas las regiones y segmentos con tendencia a la LLPS, excepto el segmento 6 (residuos 251-350), muestran un punto LCST al aumentar por encima del cual la proteína condensa. Esta observación sugiere que las interacciones hidrófobas son las fuerzas principales que dirigen la condensación de hCPEB3 (Martin and Mittag, 2018).. El segmento 6 muestra un comportamiento de fase dual característico de un diagrama de fase en forma de bucle cerrado con un punto LCST y otro LCST por encima del cual los condensados líquidos se solubilizan al aumentar la temperatura (**Figura 4.22**).

Este segmento, que incluye los residuos 254-288, es reconocido por el algoritmo catGRANULE (**Figura 4.16B**) como un determinante de separación de fases, a pesar de estar sesgado hacia la identificación de proteínas con puntos UCST, y puede explicar el comportamiento dual observado para este segmento. Cabe destacar que el motivo de la NES no es necesariamente requerido para la LLPS, pues tanto el segmento 6 como el segmento 8 fueron capaces de condensar, aunque los residuos de la NES se encontrasen separados en ambos segmentos. Tomando estos datos en su conjunto, se concluye que la zona requerida para la LLPS ocupa los residuos 254-426. Además, esta región de hCPEB3 no es capaz de formar fibras de amiloide (**Figura 4.21, 4.23A y 4.23B**) a diferencia de las que muestra el PLD en condiciones fisiológicas.

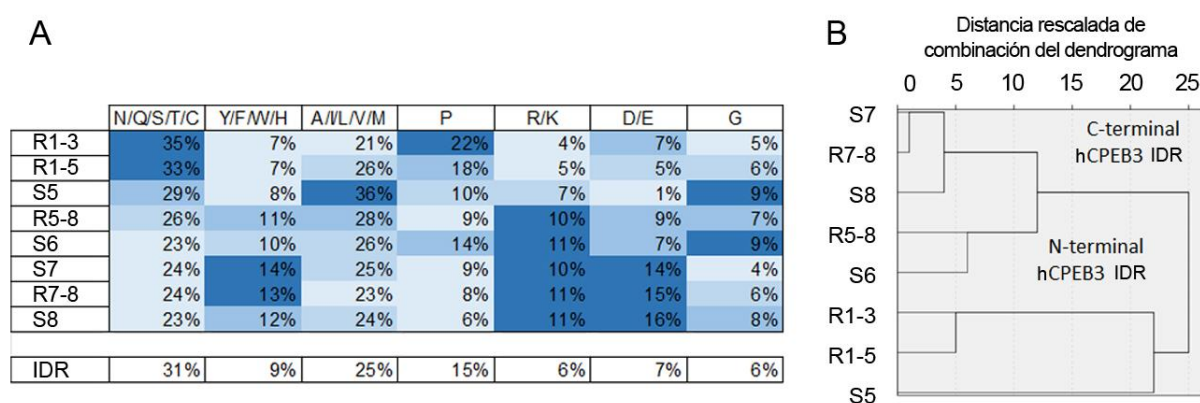


**Figura 4.23: Cinéticas de formación de amiloide de las regiones R5-8 y R7-8 de hCPEB3. (A)** Cinética de la formación de amiloide medida por fluorescencia ThT de la región R5-8 (residuos 202-450) y de la **(B)** región R7-8 (residuos 302-450aa) a las concentraciones que aparecen indicadas en los paneles.

El siguiente paso consistió en agrupar los 20 tipos de residuos aminoacídicos presentes en las proteínas en 7 clases de acuerdo a sus propiedades físico-químicas (polares sin carga, hidrófobos, aromáticos, polares con carga positiva, polares con carga negativa, prolina y glicina) para examinar su distribución en cada una de las regiones y los segmentos estudiados en este trabajo (**Fig. 4.24A**). El análisis jerárquico de conglomerados reveló que las secuencias correspondientes a la LCR del extremo N-terminal ricas en residuos de prolina y polares tienen una composición divergente y que la composición de las secuencias correspondientes al dominio que media la LLPS, que contienen la mayoría de residuos aromáticos y cargados, es

## IV, RESULTADOS

similar ( $P \leq 0,05$ ) (**Fig. 4.24B**). En este sentido, como se ha visto para otras proteínas de tipo hidrófobo (Muiznieks et al., 2018), la rápida maduración de la región R5-8 de hCPEB3 se correlaciona con un incremento en el contenido de residuos hidrófobos a diferencia de otras regiones y segmentos con velocidades más lentas (**Figura 4.22**). Estos datos sugieren que es la proporción de los tipos de residuos en la composición en comparación con las secuencias de las LCRs lo que puede predecir con mayor precisión la capacidad de las IDPs para separarse de fase (Martin and Mittag, 2018).



**Figura 4.24: Composición de aminoácidos de las regiones y segmentos de la IDR de hCPEB3.** (A) Frecuencia de cada uno de los grupos de residuos (polares sin carga, aromáticos, hidrófobos, polares con carga positiva, polares con carga negativa, prolina y glicina) en las secuencias indicadas de hCPEB3. La proporción de cada tipo de residuo en las regiones y los segmentos indicados se ha representado con un gradiente de azul claro (menor) a oscuro (mayor). (B) Dendrograma del enlace medio entre grupos del análisis mediante método jerárquico aglomerativo que muestra la distancia o divergencia entre conglomerados.

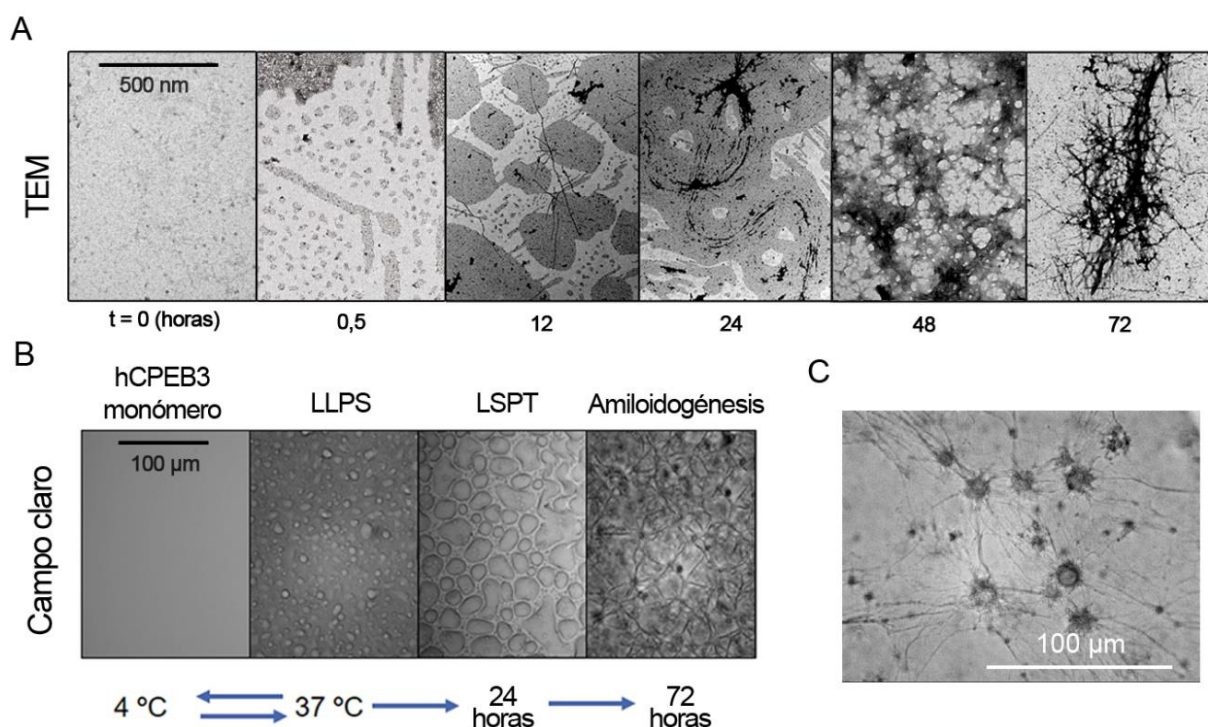
Adicionalmente, la cinética de formación de amiloide de la IDR mediada por unión a ThT muestra que la LLPS, a diferencia de lo observado para las regiones R1-3 y R1-5 que no se separan de fase, favorece la amiloidogénesis de (**Figura 4.19D**). Es probable que el incremento en la concentración local en la fase líquida permita que el PLD de hCPEB3 adopte la conformación de amiloide de forma más eficiente.

### 4.2.3. Bases moleculares de las separación y transición de fases

La IDR de hCPEB3 recién purificada en PBS a pH 7,4 se encuentra en forma soluble y no muestra turbidez a 4 °C. Sin embargo, al aumentar la temperatura a 37 °C, se observa la formación espontánea de condensados líquidos en ausencia de



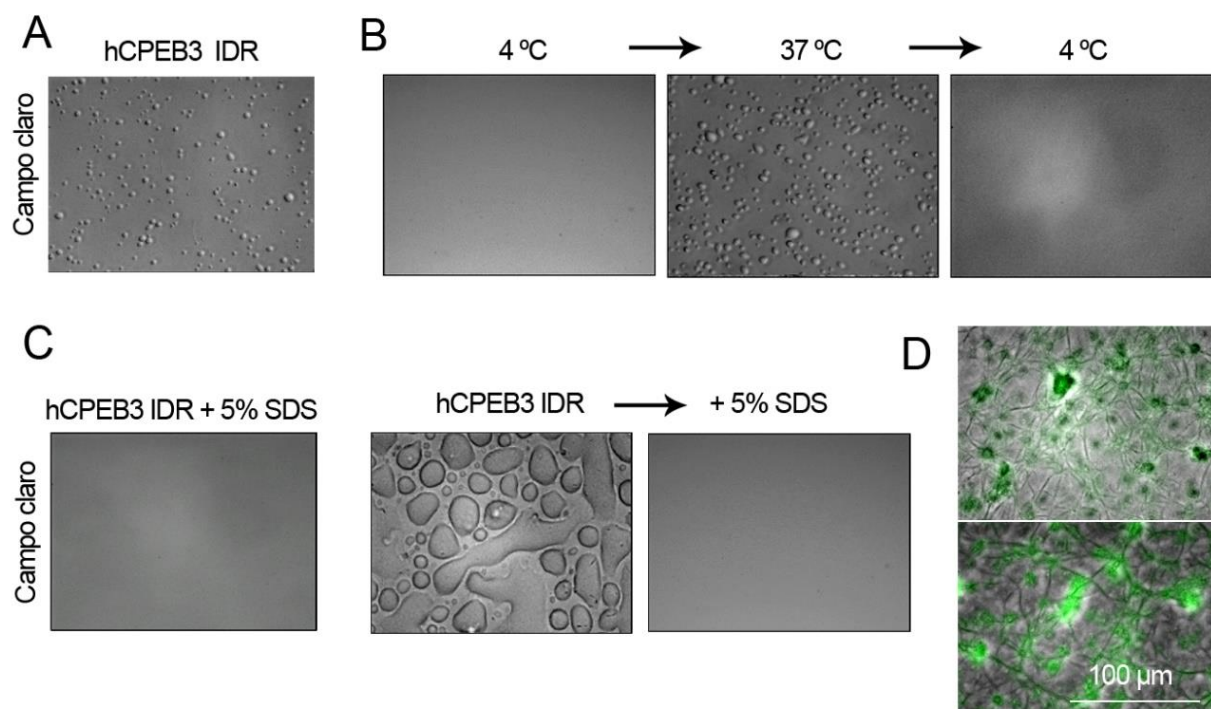
agentes precipitantes como el polietilenglicol en condiciones fisiológicas (**Figura 4.25A y 4.25B**).



**Figura 4.25: Evolución temporal de la formación de condensados líquidos, hidrogel y amiloide de la IDR de hCPEB3.** Imágenes representativas de (A) TEM y (B) campo claro de los cambios morfológicos en los condensados líquidos de 50  $\mu\text{M}$  de la IDR de hCPEB3 durante un experimento de envejecimiento de 72 horas. (C) Morfología de la conversión en forma de brote o estallido de condensados líquidos a agregados de amiloide de hCPEB3.

Además, la formación de condensados líquidos de la IDR de hCPEB3 no es específica del ión cloruro, dado que se observa un comportamiento similar cuando se emplea NaF en lugar de NaCl en el tampón de PBS (**Figura 4.26A**) y es inicialmente reversible en función de la temperatura, como se pudo observar por microscopía de campo claro (**Figura 4.26B**). Debido a la estabilización de interacciones multivalentes, los condensados líquidos evolucionan hacia un estado hidrogel sensible al tratamiento con SDS (**Figura 4.26C**) que se ha observado también en el caso de otras proteínas (Han et al., 2012). Tiempos de incubación mayores dan lugar a la formación de agregados de amiloide a partir del estado hidrogel que se unen a ThT (**Figura 4.26D**) siguiendo un patrón en forma de brote o estallido similar al reportado para la proteína FUS (**Figura 4.25A, 4.25B Y 4.25C**) (Patel et al., 2015).

## IV, RESULTADOS

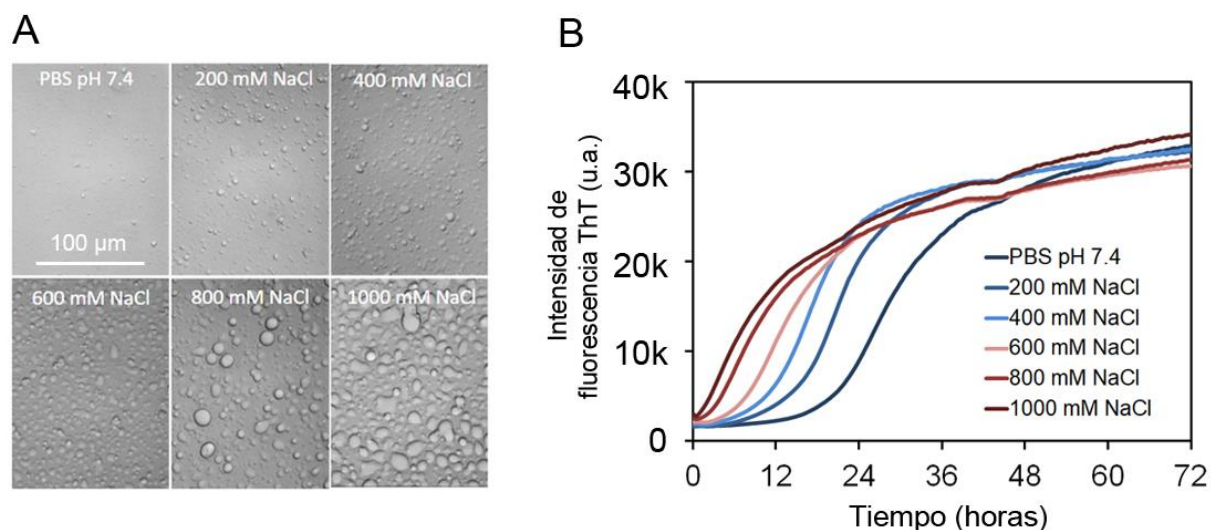


**Figura 4.26: Características de los condensados líquidos que forma la IDR de hCPEB3.** (A) Imágenes representativas de campo claro de la formación de condensados líquidos de la IDR de hCPEB3 en 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y 1 M NaF pH 7,4. (B) Efecto de la temperatura en la separación de fases. Los condensados líquidos formados por la IDR de hCPEB3 se visualizaron mediante microscopía de campo claro. (C) El panel de la izquierda muestra una imagen de campo claro representativa del efecto de 5% SDS en la LLPS de la IDR de hCPEB3 y en el panel de la derecha se muestra el efecto de solubilización de 5% SDS sobre el estado hidrogel de la IDR de hCPEB3. (D) Fibras de amiloide de la IDR de hCPEB3 teñidos con ThT visualizados mediante microscopía de fluorescencia. [hCPEB3 IDR] = 50  $\mu\text{M}$ .

Tanto el proceso de LLPS como el de formación de amiloide, muestran una dependencia de la fuerza iónica (**Figura 4.27A y 4.27B**) destacando que la amiloidogénesis del segmento 6 que incluye la zona de polialanina es más sensible al efecto de la fuerza iónica en comparación con el segmento S3 (**Figura 4.19B Y 4.19C**).

Con el fin de caracterizar con más detalle las propiedades estructurales de la LLPS de hCPEB3, se registró el espectro de CD de la IDR de hCPEB3 a 4 °C que muestra un mínimo próximo a 200 nm característico de la conformación de ovillo estadístico (**Figura 4.28A**) y que pone de manifiesto la ausencia de estructura secundaria estable como se ha observado previamente en los experimentos de RMN y el análisis bioinformático (**Figura 4.2 y 4.14A**). La pérdida de la señal con el tiempo al aumentar la temperatura hasta 37 °C se asocia con una disminución en la cantidad

soluble de IDR de hCPEB3. Sin embargo, ningún desplazamiento del valor del mínimo hacia longitudes de onda mayores característico de la estructura  $\beta$  se detectó a diferencia de lo observado para otras proteínas como tau (Ambadipudi et al., 2017).



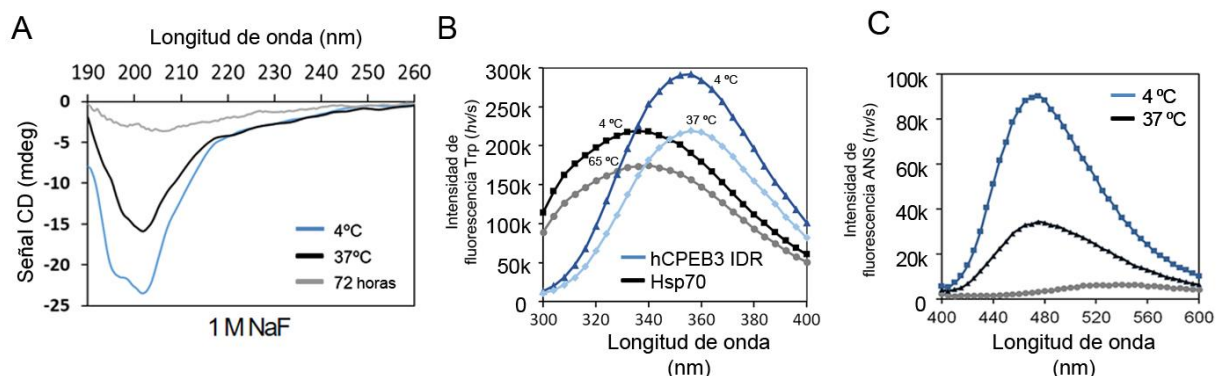
**Figura 4.27: Efecto de la fuerza iónica en la LLPS y la amiloidogénesis de la IDR de hCPEB3.** (A) Efecto de la fuerza iónica sobre la tendencia de la IDR de hCPEB3 a la LLPS mediante visualización por microscopía de campo claro (barra de escala: 100  $\mu\text{m}$ ). (B) Curvas de la cinética de fluorescencia ThT de la IDR de hCPEB3 que muestran el efecto de la fuerza iónica sobre la formación de amiloide. Cada punto representa el valor medio de tres réplicas.

La IDR de hCPEB3 contiene 5 residuos de triptófano W242, W252, W259 y W317 agrupados en el dominio que media la LLPS, y W111, en el segmento amiloidogénico. La posible existencia de un núcleo hidrófobo estable se evaluó midiendo la fluorescencia intrínseca del triptófano cuya longitud de onda de emisión  $\lambda_{\text{max}}$  es  $> 350 \text{ nm}$  cuando el triptófano está expuesto al solvente y  $< 340 \text{ nm}$  cuando se encuentra localizado en un entorno no polar. La fluorescencia intrínseca de los residuos de triptófano de la IDR de hCPEB3 muestra un máximo a una longitud de onda  $\lambda_{\text{max}} > 350 \text{ nm}$  (**Figura 4.28B**) que indica la ausencia de un núcleo hidrófobo en la IDR de hCPEB3. La fluorescencia intrínseca de los residuos de triptófano de la chaperona Hsp70 fue usada en este experimento como control.

La presencia de pequeños parches hidrófobos expuestos al solvente fue estudiada utilizando ANS, un compuesto orgánico cuyo espectro de emisión muestra un aumento de la fluorescencia y un desplazamiento hacia 470 nm al interactuar con superficies hidrófobas (Rosen and Weber, 1969). Los cambios espectrales

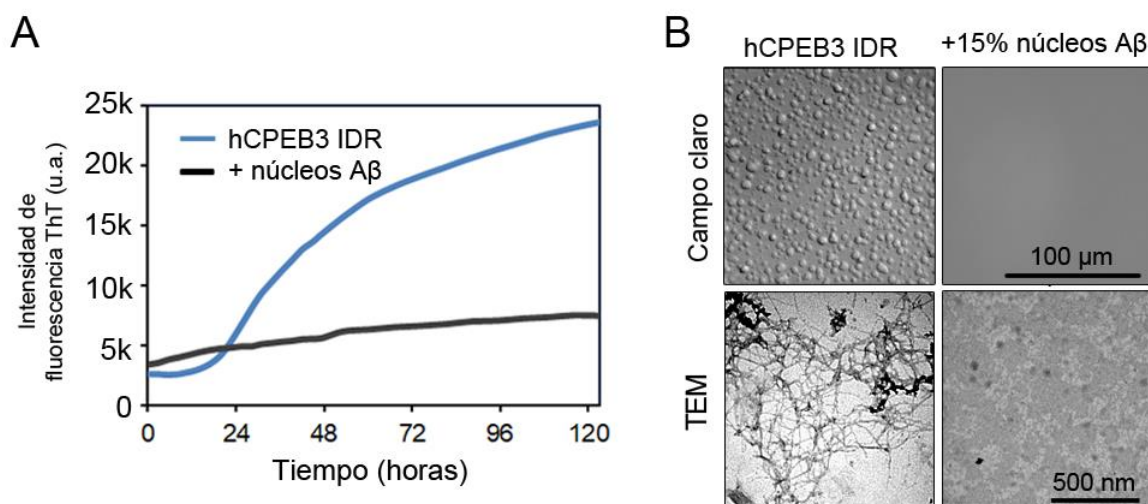
## IV, RESULTADOS

asociados a la LLPS de la IDR de hCPEB3 indican el posible ocultamiento de las zonas hidrófobas (**Figura 4.28C**).



**Figura 4.28: Caracterización estructural de la LLPS de la IDR de hCPEB3.** (A) Espectro de CD en la región del ultravioleta lejano de 5-10  $\mu\text{M}$  de la IDR de hCPEB3 en forma de monómero a 4°C o en forma de condensado líquido a 37 °C y tras 72 horas de incubación a 25 °C. (B) Efecto de la temperatura en los espectros de emisión de la fluorescencia intrínseca del triptófano de la IDR de hCPEB3 y Hsp70. (C) Fluorescencia de emisión ANS de la IDR de hCPEB3 en estado monomérico a 4°C, condensado líquido a 37°C y en presencia de 3 M de GdmCl (gris).

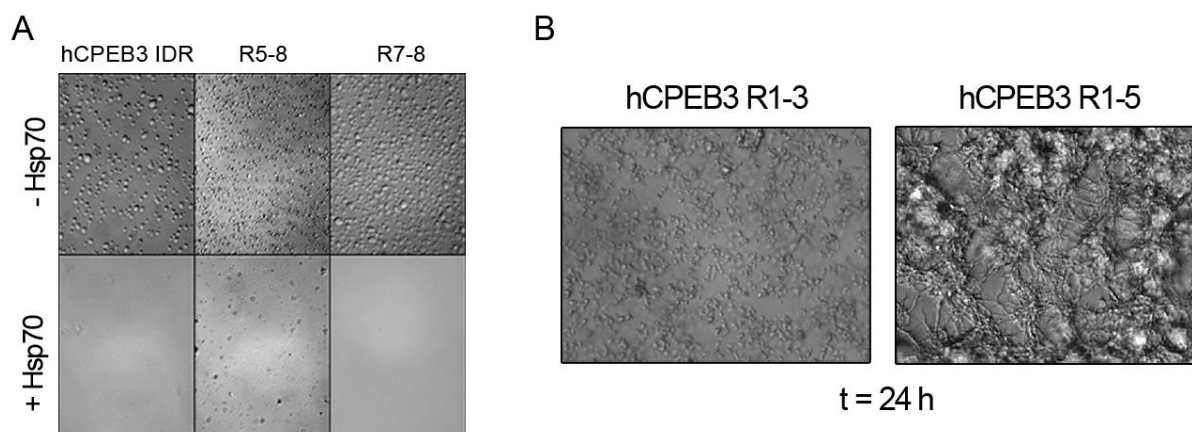
Por otra parte, se sabe que los residuos hidrófobos en la mitad del extremo C-terminal del péptido  $A\beta_{42}$  están implicados en promover la agregación patológica en la enfermedad de Alzheimer (Kim and Hecht, 2006). De forma inesperada, se observó que la presencia de núcleos preformados de amiloide  $A\beta_{42}$  es capaz de inhibir la LLPS y la subsecuente formación de amiloide (**Fig. 4.29A y 4.29B**).



**Figura 4.29: Inhibición de la LLPS y la amiloidogénesis de la IDR de hCPEB3 en presencia del amiloide de  $A\beta_{42}$ .** (A) Efecto de 15% de núcleos preformados de amiloide de  $A\beta_{42}$  sobre la amiloidogénesis de la IDR de hCPEB3 monitorizada por fluorescencia ThT. (B) Imágenes representativas de TEM y campo claro mostrando el efecto de la presencia de núcleos preformados de amiloide de  $A\beta_{42}$  sobre la condensación y amiloidogénesis de la IDR de hCPEB3.



Debido a la naturaleza hidrófoba de  $A\beta_{42}$ , el efecto inhibitorio podría ser atribuido a la perturbación de una hipotética interacción entre las zonas hidrófobas de  $A\beta_{42}$  y el PLD de hCPEB3. Estos resultados sugieren que la interacción entre los residuos hidrófobos y la zona  $Q_4RQ_4$  es fundamental para la formación de amiloide.

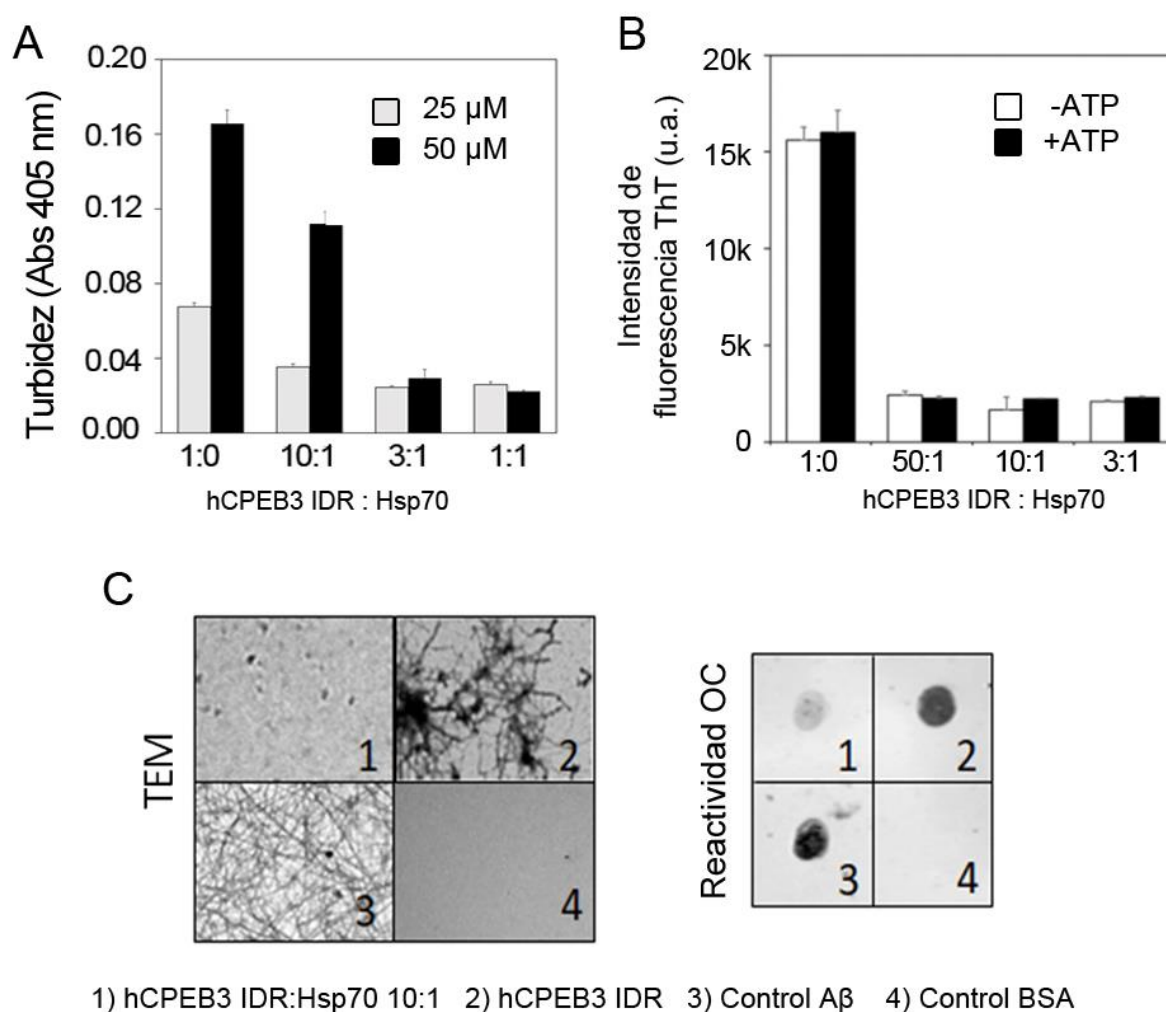


**Figura 4.30: Efecto de la chaperona Hsp70 sobre la condensación de hCPEB3. (A)** Imágenes representativas de campo claro de la formación de condensados líquidos a 37 °C de 50  $\mu$ M de la IDR de hCPEB3 y de las regiones indicadas en ausencia o en presencia de la Hsp70 en la proporción molar 1:1 tras 30 minutos de incubación. [hCPEB3 IDR]; [hCPEB3 R5-8]; [hCPEB3 R7-8] = 50  $\mu$ M. **(B)** Imágenes representativas de campo claro de la oligomerización de las regiones R1-3 y R1-5 (residuos 1-300) de hCPEB3 tras 24 horas de incubación a 37 °C: [hCPEB3 R1-3] = 0.5 mM; [hCPEB3 R1-5] = 0.2 mM.

Se ha descrito que las chaperonas Hsp70/Hsp90 bloquean la formación de amiloide del péptido  $A\beta_{42}$  y de la proteína  $\alpha$ -sinucleína *in vitro* (Lackie et al., 2017), demostrándose que la Hsp70 tiene capacidad para interactuar con zonas hidrófobas expuestas de sus sustratos (Clerico et al., 2015). Por ello, se examinó el posible efecto de la Hsp70 en la condensación y amiloidogénesis de la IDR de hCPEB3. La incubación de la Hsp70 recombinante con la IDR de hCPEB3 a 37 °C resulta en la inhibición de la LLPS (**Figura 4.30A**). Particularmente, se ha observado que la interacción con la zona de polialanina no es requerida para bloquear la separación de fases, como se refleja en los resultados obtenidos con la región R7-8 (**Figura 4.30A**). En este sentido, se ha visto que la zona hidrófoba de polialanina favorece la formación de estructuras fibrosas de mayor tamaño cuando comparamos la región R1-5 y R1-3, la cual carece de este segmento (**Figura 4.30B**).

## IV, RESULTADOS

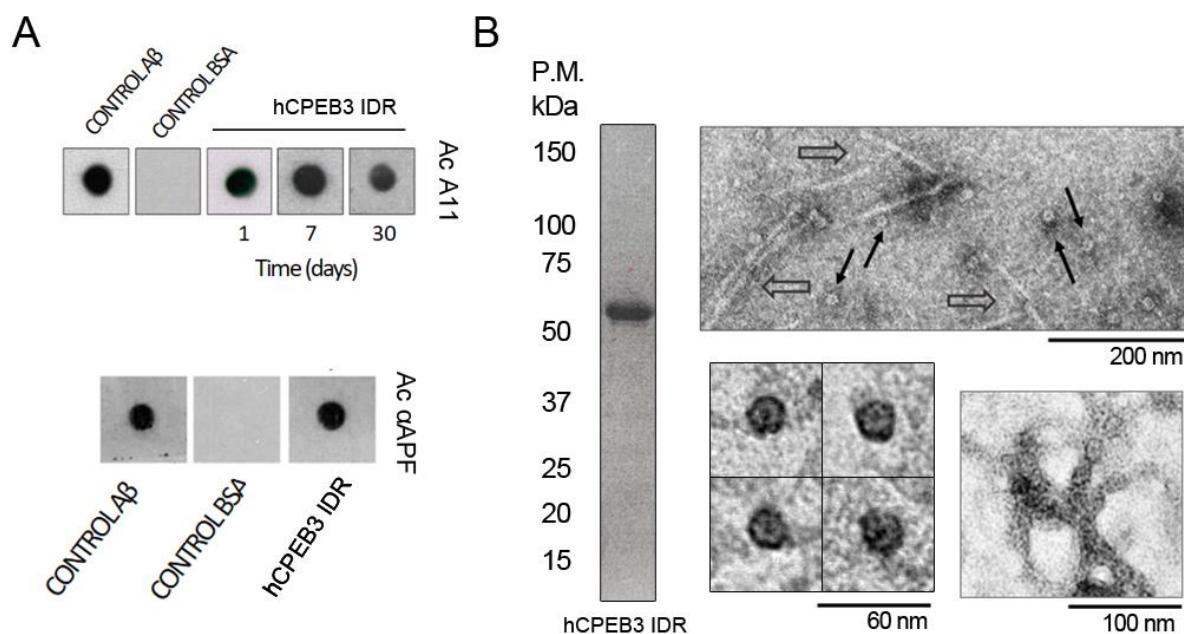
Las medidas de turbidimetría a 405 nm muestran que la Hsp70 es capaz de bloquear la formación de gotas líquidas de la IDR de hCPEB3 a una concentración equimolar (**Figura 4.31A**) y también la formación de amiloide, particularmente, a una concentración subequimolar, tanto en presencia como en ausencia de ATP (**Figura 4.31B**). Estos resultados fueron confirmados mediante TEM y ensayos de *immunodot blot* (**Figura 4.31C**).



**Figura 4.31: Efecto de la chaperona Hsp70 sobre la formación de amiloide de la IDR de hCPEB3.** (A) Formación de condensados líquidos de la IDR de hCPEB3 monitorizada por turbidimetría a 405 nm en ausencia o en presencia de cantidades crecientes de chaperona. Los datos que aparecen representados corresponden al valor medio de tres réplicas y las barras de error muestran el SEM. (B) Valores medios de tres réplicas y barras de error indicando el SEM en el punto final de la cinética de formación de amiloide monitorizada mediante fluorescencia ThT de 25  $\mu$ M de la IDR de hCPEB3 en presencia de cantidades crecientes de Hsp70 y en ausencia o presencia de 2 mM de ATP. (C) Micrografías de TEM e *immunodot blot* con el anticuerpo OC del análisis de la agregación amiloide de la IDR de hCPEB3 en ausencia o presencia de la chaperona en la proporción molar 10:1 respectivamente.

#### 4.2.4. Estudio comparativo con los amiloides patológicos

Tanto los amiloides funcionales como los patológicos estudiados forman especies oligoméricas tóxicas metaestables (Hervás et al., 2016, 2020b; Krishnan et al., 2012). Sin embargo, en el caso de los amiloides funcionales, los confórmeros tóxicos tienen una vida media corta y evolucionan rápidamente hacia fibras de amiloide maduras y menos tóxicas en cuestión de horas (Hervás et al., 2016; Krishnan et al., 2012). Por el contrario, en el caso de los amiloides patológicos estos confórmeros tóxicos tienen una vida media larga de semanas (Bucciantini et al., 2002, 2004).



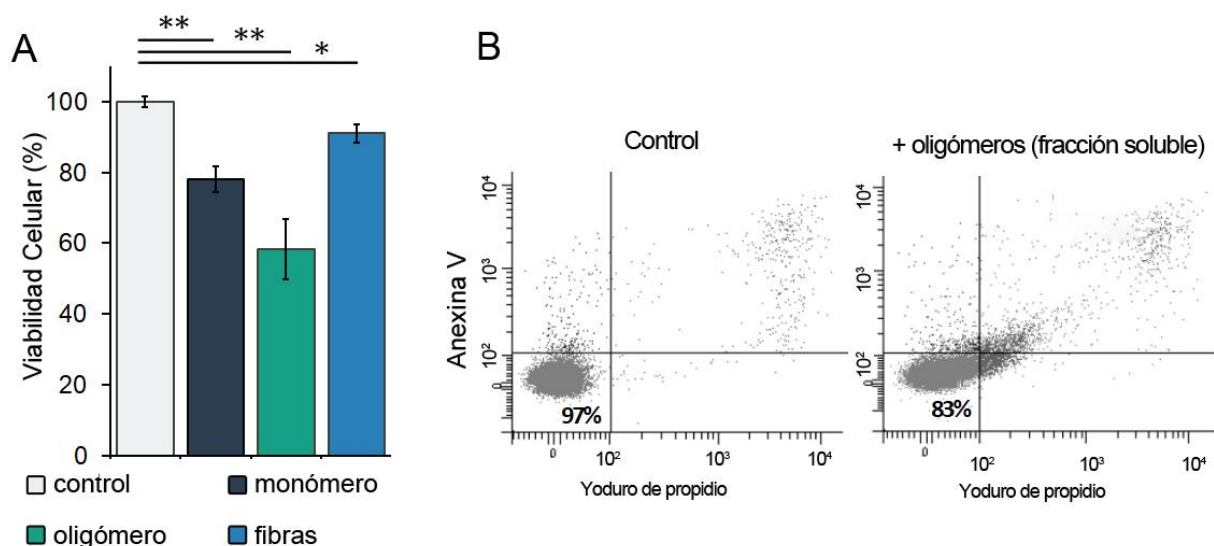
**Figura 4.32: La IDR de hCPEB3 tiene características en común con los amiloides patológicos.**

(A) Análisis por *immunodot blot* que muestra la presencia de oligómeros tóxicos estables formados por la IDR de hCPEB3 y reconocidos por los anticuerpos A11 y de oligómeros anulares reconocidos por el anticuerpo  $\alpha$ APF. (B) Gel del 10% de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie muestra la banda correspondiente a la IDR de hCPEB3 recombinante purificada en forma de monómero. El panel superior de imágenes de TEM de la formación de oligómeros anulares (flechas negras) y protofibrillas (flechas transparentes) de la fracción soluble. El panel inferior de la izquierda muestra la morfología característica de los oligómeros anulares. El panel inferior de la derecha muestra los detalles estructurales de la asociación lateral propia de los oligómeros anulares. PM; peso molecular.

De forma similar a lo que ocurre con otros amiloides, se observó la formación de especies tóxicas durante la amiloidogénesis de la IDR de hCPEB3 según indican los resultados obtenidos con el anticuerpo A11 (Figura 4.32A). Sin embargo, a

## IV, RESULTADOS

diferencia de otros amiloides funcionales como Pmel17 (Fowler et al., 2005), ApCPEB (Si et al., 2010), Orb2 (Hervás et al., 2016) and Sup35 (Krishnan et al., 2012), los oligómeros tóxicos metaestables formados por la IDR de hCPEB3 tienen una estabilidad temporal mayor, similar a la de los amiloides patológicos como  $A\beta_{42}$  (Figura 4.32A) (Bartolini et al., 2011).

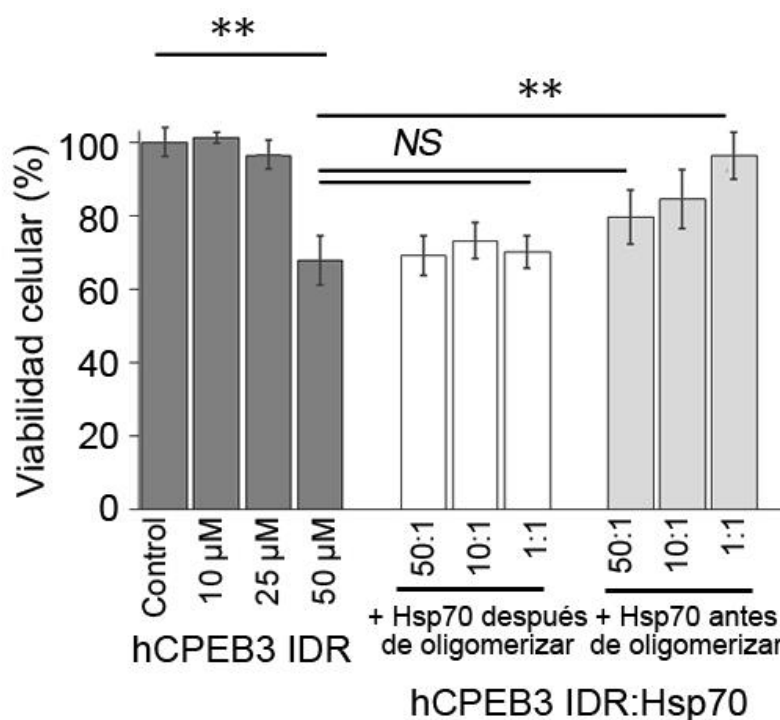


**Figura 4.33: Citotoxicidad mediada por las especies amiloides de la IDR de hCPEB3. (A)** Viabilidad celular de células SH-SY5Y tratadas con la IDR de hCPEB3 en forma de monómero, oligómeros solubles y protofibrillas, o fibras de amiloide. Las barras de error indican el SEM de tres experimentos independientes. Los valores  $P$  fueron calculados utilizando el test de la  $t$  de Student; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ . **(B)** Análisis por citometría de flujo de los niveles de necrosis y apoptosis de células SH-SY5Y expuestas a oligómeros tóxicos de la IDR de hCPEB3.

Mediante microscopía electrónica se ha identificado la presencia de oligómeros anulares que presentan la capacidad de agruparse mediante asociación lateral (Figura 4.32B). La formación de esta especie particularmente tóxica se ha observado también en otras proteínas amiloidogénicas como TDP-43 (Fang et al., 2014),  $\alpha$ -sinucleína (Chen et al., 2015; Fusco et al., 2017; Lorenzen et al., 2014),  $A\beta_{42}$  (Kayed et al., 2009), transtiretina (Pires et al., 2012) y RepA-WH1 (Fernandez et al., 2016). La presencia de oligómeros anulares se comprobó también mediante la técnica de *immunodot blot* utilizando el anticuerpo  $\alpha$ APF (Figura 4.32A) (Kayed et al., 2009). Además, se ha demostrado que las especies oligoméricas formadas por la IDR de hCPEB3 son las especies más tóxicas e inducen muerte celular mediante el mecanismo de necrosis (Figura 4.33A y 4.33D) (Behl et al., 1994).



La Hsp70 no es capaz de atenuar la citotoxicidad una vez que las especies oligoméricas de la IDR de hCPEB3 se han formado aunque es capaz de impedirla cuando la chaperona se co-incuba con la IDR de hCPEB3 en estado monomérico (**Figura 4.33**). En concreto, a una concentración subequimolar de la Hsp70 capaz de prevenir la formación de amiloide de la IDR hCPEB3, la citotoxicidad no es abolida hasta que la LLPS es suprimida por completo (**Figura 4.33**). Estos resultados sugieren que la formación de oligómeros tóxicos es promovida por la condensación y que, probablemente, su formación no sigue la misma vía que el ensamblado amiloide.



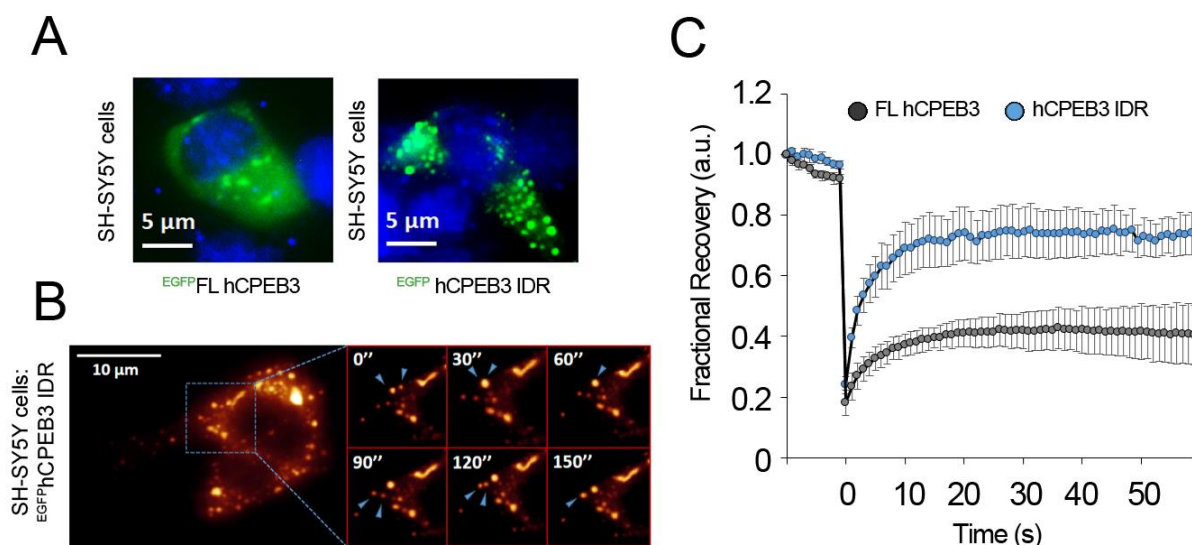
**Figura 4.33: Efecto de la Hsp70 sobre la citotoxicidad mediada por los oligómeros de la IDR de hCPEB3.** Las barras de error indican el SEM de tres experimentos independientes. Los valores  $P$  se determinaron usando el test de la  $t$  de Student; *NS*, diferencia no significativa; \*\*,  $P < 0.01$ .

#### 4.2.5. Dinámica molecular en células neuronales

Finalmente, se examinó por microscopía de fluorescencia la capacidad de hCPEB3 para formar condensados biomoleculares en células vivas mediante la sobreexpresión transitoria de la FL y la IDR de hCPEB3 en células SH-SY5Y de neuroblastoma. La FL de hCPEB3 unida EGFP se separa de fase en gránulos citoplasmáticos de morfología irregular a diferencia de la IDR de hCPEB3 que forma

## IV, RESULTADOS

gránulos esféricos (**Fig. 4.34A**). Además, se observaron frecuentes eventos de fusión para RGFP-hCPEB3 IDR durante su monitorización en periodos de 60 s (**Fig. 4.34B**). Por el contrario, ni eventos de fusión ni movimiento neto de los gránulos se detectaron en la misma escala de tiempo para EGFP-FL hCPEB3. Así pues, tanto la morfología de los gránulos como la falta de fluidez observadas sugieren una mayor viscosidad para la FL de hCPEB3.



**Figura 4.34: Viscosidad de los gránulos de hCPEB3 en células vivas SH-SY5Y. (A)** Micrografías de fluorescencia representativas de células vivas SH-SY5Y transfectadas de forma transitoria que sobreexpresan  $^{EGFP}FL$  hCPEB3 o  $^{EGFP}hCPEB3$  IDR. Los núcleos se muestran teñidos con Hoechst en azul. **(B)** Micrografías de fluorescencia representativas de los eventos de fusión de gránulos citoplasmáticos de  $^{EGFP}hCPEB3$  IDR en células SH-SY5Y. En los paneles de la derecha se muestra una ampliación de la imagen. **(C)** Experimento de FRAP de  $^{EGFP}FL$  hCPEB3 o  $^{EGFP}hCPEB3$  IDR. En la gráfica se muestran los valores medios (puntos) y las curvas de recuperación (líneas). Las barras de error representan el SEM.

Para caracterizar con mayor precisión la naturaleza de estos ensamblados, se realizaron experimentos de FRAP para EGFP-FL hCPEB3 y EGFP-hCPEB3 IDR. Las rápidas velocidades de recuperación FRAP ( $0,25 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$  para EGFP-hCPEB3 IDR y  $0,172 \pm 0,005 \text{ s}^{-1}$  para EGFP-FL hCPEB3) indican que los gránulos se comportan como líquidos y que los gránulos de EGFP-hCPEB3 IDR son menos viscosos en comparación con la FL de hCPEB3. Si bien en ambos casos, los gránulos están en constante intercambio con el citoplasma que los rodea (**Fig. 4.34C**).

Estos resultados muestran que hCPEB3 puede formar condensados biomoleculares en células SH-SY5Y. Las diferencias observadas entre las dos construcciones utilizadas sugieren que los RRM no son requeridos para la separación de fases, sino que son los responsables, o más bien su unión al ARNm, de estabilizar y hacer más rígidos los gránulos de hCPEB3.

**Parte V**  
**DISCUSIÓN**

## V. DISCUSIÓN

El mecanismo molecular que posibilita el mantenimiento de la memoria a largo plazo a pesar del rápido recambio que sufren las proteínas celulares es todavía una cuestión sin resolver. A pesar de ello, se sabe que las proteínas prionoides de la familia CPEB tienen la capacidad de adoptar un estado autopetuable que permitiría mediar este proceso. En concreto, estas proteínas pueden adoptar un estado amiloide funcional que media la traducción del ARNm regulando el reforzamiento sináptico y la consolidación de la memoria (Hervás et al., 2020a).

El análisis biofísico general de la IDR de hCPEB3 demostró la ausencia de estructura secundaria estable. No obstante, esta región sí presenta zonas de estructura secundaria parcial a nivel local que parecen ser clave para su función neuronal (**Figura 5.1**).



**Figura 5.1: Representación esquemática de la estructura y composición de hCPEB3.** La IDR de hCPEB3 (gris) contiene elementos de secuencia clave con conformaciones preferentes en forma de hélice  $\alpha$  (azul) y de hélices PPII (verde), un segmento amiloidogénico rico en residuos de glutamina (magenta) y otro hidrófobo (negro), un residuo de tirosina putativamente fosforilable (morado), un residuo de lisina predicho como sumoilable (naranja) y una zona altamente desordenada (rojo). El esquema incluye los dos RRM (cian) y el motivo dedo de cinc (turquesa) de estructura plegada en el extremo C-terminal.

En comparación con los dominios plegados de las proteínas globulares, las secuencias de las IDPs tienden a no conservarse durante el curso de la evolución debido a la ausencia de requerimientos estructurales para su plegamiento (Brown et al., 2002). En el caso particular de hCPEB3, las secuencias de la hélice  $\alpha$  del extremo N-terminal y la de la NES, así como el sitio putativo de fosfotirosina, están bien

## VI. DISCUSIÓN

conservados en los vertebrados, lo que sugiere firmemente que son elementos importantes para la función biológica de la proteína. Los segmentos adicionales, como el núcleo hidrófobo que participa en la formación de amiloide y la agrupación de los residuos de triptófano W242, W252 y W259 están también estrictamente conservados de mamíferos a peces. Por el contrario, el segmento rico en residuos de glutamina Q<sub>4</sub>RQ<sub>4</sub> del extremo N-terminal, las regiones ricas en residuos de prolina y las hélices  $\alpha$  de las repeticiones de alanina sí están conservados en mamíferos, pero no en todos los vertebrados. De forma similar, se ha observado un incremento en el contenido de residuos de alanina en forma de repeticiones en otras proteínas como las ataxinas 2 y 7 de los mamíferos en comparación con sus homólogos en *Drosophila*.

Cabe destacar que, en la secuencia de CPEB3 de algunos vertebrados inferiores, existe una región alternativa a esta región rica en residuos de glutamina posicionada a continuación del núcleo hidrófobo amiloidogénico. La rápida evolución de estos elementos podría estar relacionada con el desarrollo del cerebro de los mamíferos en comparación con el de los vertebrados inferiores, o bien por la necesidad de una mayor estabilidad estructural a causa del mecanismo homeotermo que regula la temperatura corporal y que podría ser aportada por el segmento de poliglutamina. Resultaría muy interesante abordar esta cuestión a partir del estudio comparativo con sus homólogos en anfibios y peces, y la generación de CPEB3 quimera. Por otra parte, la capacidad de este segmento rico en residuos de glutamina para cambiar su posición o ser sustituido por un núcleo amiloidogénico más hidrófobo sin perder su función pone de manifiesto la naturaleza modular de los PLDs ya demostrada previamente para su homólogo en *Drosophila*, Orb2A (Hervás et al., 2016).

En la última década, se han caracterizado los PLDs de diferentes proteínas que participan en la regulación de la transcripción y el metabolismo del ARN. Algunos de estos dominios corresponden a proteínas como la huntingtina (Jayaraman et al., 2012), el receptor androgénico (Eftekharzadeh et al., 2016), la ataxina-7 (Hong et al., 2019) y la TDP-43 (Lim et al., 2016), las cuales presentan un segmento hidrófobo que adopta una estructura de hélice  $\alpha$  y que precede a un segmento rico en residuos de glutamina, o bien de glutamina y asparagina, que adopta la conformación de amiloide (**Tabla 5.1**). Se ha propuesto que estas hélices  $\alpha$  de carácter hidrófobo

pueden promover asociaciones intermoleculares, bien para formar hélices superenrolladas (Pelassa et al., 2014) o condensados biomoleculares a través de la LLPS (Conicella et al., 2016). En el caso de la huntingtina, el segmento de poliglutamina está seguido de una zona rica en residuos de prolina que se mantiene en una conformación de hélice PPII y que se ha demostrado que enlentece fuertemente la formación de amiloide *in vitro* (Bhattacharyya et al., 2006).

PROTEÍNA	SECUENCIA
Huntingtin	M <sub>001</sub> ATLEKLMKA FESLKSF <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> PP <sup>P</sup> P <sup>P</sup> P <sup>P</sup> P <sup>P</sup> P <sup>P</sup> P <sup>P</sup> P <sup>P</sup> Q <sup>Q</sup> LP <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> P <sup>P</sup> P <sup>Q</sup> AQ <sup>P</sup>
ANDROGEN RCPT	H <sub>041</sub> PEAASAAPP GASLLLL <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> ETSP <sup>R</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> QGEGDGS <sup>P</sup> QAH
TDP-43	P <sub>319</sub> AMMAAAQAA L <sup>Q</sup> SSWGMMGM LAS <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> N <sup>Q</sup> SG <sup>P</sup> SG <sup>N</sup> N <sup>Q</sup> N <sup>Q</sup> GM <sup>Q</sup> Q <sup>R</sup> EP <sup>N</sup> QAFGS F <sup>N</sup> N <sup>Q</sup> SYSSINI
Ataxin-7	A <sub>016</sub> AAAAGGAAA AAAR <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> PP <sup>P</sup> P <sup>P</sup> Q <sup>P</sup> Q <sup>R</sup> Q <sup>Q</sup> H <sup>P</sup> PP <sup>P</sup> P <sup>P</sup> RRTR <sup>P</sup> EDGG <sup>P</sup> GAASTSAAAM
hCPEB3	M <sub>001</sub> QDDLMDKS KT <sup>Q</sup> Q <sup>P</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>R</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>P</sup> Q <sup>E</sup> SSVSEAPSTP LSSET <sup>P</sup> K <sup>P</sup> EE NSAL <sup>P</sup> ALSPA
<i>Drosophila</i> Orb2A	M <sub>001</sub> YNK <sup>F</sup> VNFIC GGL <sup>P</sup> N <sup>L</sup> N <sup>L</sup> N <sup>K</sup> PP <sup>Q</sup> L <sup>H</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>H</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>H</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>H</sup> Q <sup>H</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>L</sup> H <sup>Q</sup> H <sup>Q</sup> Q <sup>L</sup> S <sup>P</sup> N <sup>L</sup> SALH
<i>Aplysia</i> CPEB	F <sub>030</sub> EIFRRINAL LDNSLEANNV SCS <sup>S</sup> CS <sup>S</sup> Q <sup>S</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> T <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> ML <sup>Q</sup> QV <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> Q <sup>Q</sup> LLK <sup>Q</sup>

**Tabla 5.1: Las hélices  $\alpha$  hidrófobas y las zonas ricas en residuos de prolina modulan la formación de amiloide de los segmentos ricos en residuos de Q y Q/N.** Los residuos no polares están sombreados en gris, los residuos de glutamina y asparagina en magenta y los residuos de prolina en verde para las secuencias indicadas.

Es importante mencionar que si bien hCPEB3 y sus homólogos Orb2 y ApCPEB poseen residuos que desestabilizan la conformación de hélice  $\alpha$  entre la hélice  $\alpha$  N-terminal y el segmento rico en residuos de glutamina (prolina en hCPEB3, histidinas cargadas positivamente en Orb2A (Hervás et al., 2020a; Oroz et al., 2020), y, serina y valina en el caso de ApCPEB), ninguno de estos elementos “bloqueantes” de la estructura en hélice  $\alpha$  están presentes en los segmentos análogos para la huntingtina, el receptor androgénico o TDP-43 (Tabla 5.1). La ausencia de estos elementos parece permitir a los segmentos de poliglutamina interactuar con la hélice  $\alpha$  a través de la formación de enlaces de hidrógeno entre la cadena lateral y la cadena principal, como ocurre para el receptor androgénico (Escobedo et al., 2019), durante el inicio del cambio conformacional a amiloide y formar parte de la estructura como han propuesto recientemente David S. Eisenberg y sus colaboradores para TDP-43 (Cao et al., 2019). A partir de estas observaciones, se propone la hipótesis de que la presencia de residuos que bloquean la estructura entre la hélice  $\alpha$  y el segmento rico en residuos de glutamina en los amiloides funcionales, así como su ausencia en los

## VI. DISCUSIÓN

amiloides patológicos, es una diferencia fundamental que podría considerarse la base molecular que subyace a su toxicidad.

Las hélices PPII, que aparecen en ciertas proteínas ricas en residuos de glicina como el colágeno (Pentelute et al., 2008), pueden realizar funciones importantes durante la formación de los condensados biomoleculares mediante interacciones proteína-proteína (Guo et al., 2019). Si bien los desplazamientos químicos conformacionales son una herramienta extremadamente útil para identificar y cuantificar poblaciones de hélices  $\alpha$  y hebras  $\beta$  tanto para IDPs como para proteínas plegadas, los desplazamientos químicos conformacionales de las hélices PPII están menos caracterizados. La IDR de hCPEB3 contiene 66 prolinas en su secuencia (15% del total). Teniendo en cuenta todos los desplazamientos químicos que se han obtenido en este trabajo para los residuos de prolina, que incluyen las asignaciones de  $^{15}\text{N}$  y que son poco habituales en la bibliografía, se propone un patrón de desplazamientos químicos conformacionales característico que define la estructura de hélice PPII (**Tabla 5.2**). En combinación con los valores estándar publicados recientemente para los manojos de hélices PPII ricos en residuos de glicina (Treviño et al., 2018), esta información puede ser de gran utilidad en la detección de hélices PPII frecuentes en condensados biomoleculares y en la elucidación de su papel en fisiología y patología.

	hélice $\alpha$	hebra $\beta$	manejo de hélices PPII rico en glicina	hélice PPII aislada rica en prolina
$\delta\Delta^{13}\text{C}\alpha$	3,1 <sup>a</sup> / 2,9 <sup>b</sup>	-1,5 <sup>a</sup> / -1,8 <sup>b</sup>	-0,6 <sup>d</sup>	+0,6 <sup>e</sup>
$\delta\Delta^{13}\text{C}\beta$	-0,4 <sup>a</sup> / -0,8 <sup>b</sup>	+2,2 <sup>a</sup> / +2,7 <sup>b</sup>	+0,3 <sup>d</sup>	-1,0 <sup>e</sup>
$\delta\Delta^{13}\text{CO}$	2,2 <sup>c</sup> / 2,2 <sup>b</sup>	-2,2 <sup>c</sup> / -2,1 <sup>b</sup>	-0,2 <sup>d</sup>	-0,3 <sup>e</sup>

**Tabla 5.2: Desplazamientos químicos conformacionales de estructura secundaria en hélice  $\alpha$ , hebra  $\beta$  y hélices PPII.** <sup>a</sup> Spera y Bax (1991), <sup>b</sup> Wang y Jardetzky para alanina (2002), <sup>c</sup> calculado por Wishart y Skyes (1994), <sup>d</sup> Treviño *et al.* (2018) y <sup>e</sup> determinado en este estudio.

Previamente se ha demostrado que los residuos 217-284 de mCPEB3 son fundamentales para su interacción con el citoesqueleto de actina (Stephan et al., 2015). Teniendo en cuenta estas observaciones, se propone una posible asociación



entre las hélices  $\alpha$  formadas por los residuos 1-12 y 202-246 que podría favorecer la interacción de las hélices PPII formadas por los residuos 86-94 y 116-170 con la profilina. Esta proteína tiene un segundo sitio de unión específico para la actina y promueve la formación de redes de filamentos de actina (Ferron et al., 2007) que se vuelven más extensos y robustos durante la sinaptogénesis en la consolidación de la memoria (Basu and Lamprecht, 2018).

Por su parte, la hélice  $\alpha$  de TDP-43 tiene casi 6 vueltas de longitud y las tres primeras están estabilizadas por residuos de alanina y metionina que tienen una gran tendencia intrínseca adoptar una estructura en forma de hélice  $\alpha$ . Aunque la mayoría de residuos hidrófobos están agrupados en el lado no polar de la hélice  $\alpha$ , el residuo W334 se encuentra expuesto en el lado polar. Se sabe que este residuo media los contactos intermoleculares que median la LLPS (Li et al., 2018).

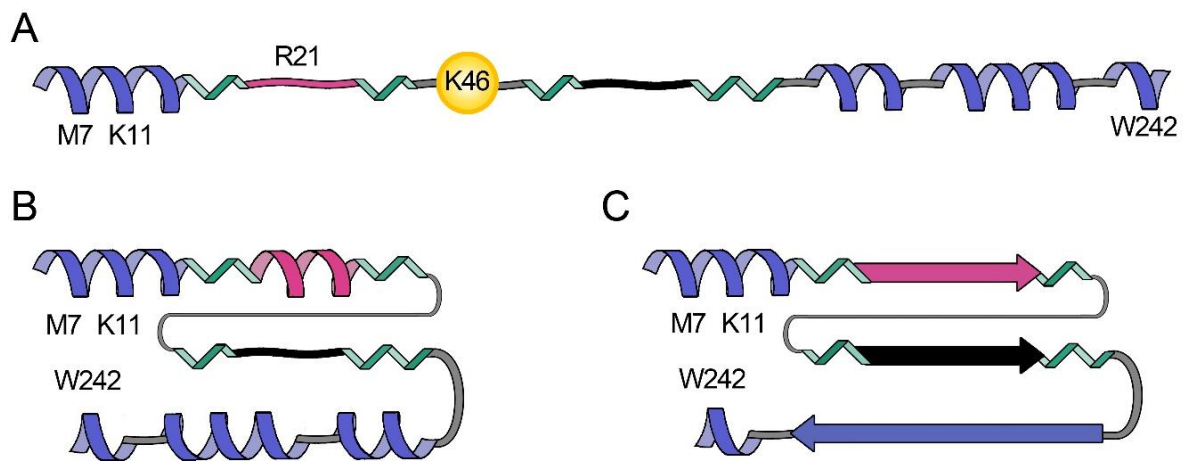
En comparación, la hélice  $\alpha$  de ApCPEB está constituida por 4 vueltas, las dos primeras tienen un lado hidrófobo bien definido mientras que la tercera y cuarta tienen un carácter más polar y se sabe que los residuos de leucina y asparagina contribuyen a la estabilidad y especificidad de los contactos entre hélices  $\alpha$  de las hélices superenrolladas (Oakley and Kim, 1998).

Particularmente, la hélice  $\alpha$  de Orb2 es más corta con solo 3 vueltas, es menos estable debido a los cuatro residuos de asparagina y uno de valina (con una baja tendencia a la formación de estructura en hélice  $\alpha$ ) y tiene carácter anfipático, con una zona no polar y otro polar bien definidas, y el residuo F5 situado en el centro del lado hidrófobo. Se ha demostrado que este residuo es esencial para la formación del amiloide y la consolidación de la memoria (Majumdar et al., 2012). Además, se ha observado recientemente por RMN que el grupo de residuos que siguen al segmento de poliglutamina en Orb2 54-PNLSALH-60 pueden adoptar una hélice  $\alpha$  parcial (Oroz et al., 2020) estabilizada por interacciones hidrófobas  $i, i+3$  (L58, L61), la caperuza N (P56, N57) y las interacciones carga-macrodi polo (H62) (Chakrabarty and Baldwin, 1995).

En el caso de hCPEB3, los 30 primeros residuos están muy conservados en mamíferos, y bastante conservados entre mamíferos y reptiles, lo que sugiere una gran relevancia funcional (**Figura 4.1**). La hélice  $\alpha$  que forma este segmento está compuesta por residuos cuya tendencia intrínseca a la formación de hélice  $\alpha$  es

## VI. DISCUSIÓN

significativamente menor que la propensión de los residuos de la hélice  $\alpha$  en la TDP-43. Este hecho sugiere que para que esta hélice  $\alpha$  se estabilice, podrían ser necesarias interacciones de largo alcance. En este sentido, la mayoría de los residuos hidrófobos están agrupados formando un lado hidrófobo en la hélice  $\alpha$  con excepción del residuo M7, que se encuentra en el lado hidrofílico. Estos residuos hidrófobos excepcionalmente expuestos, como ocurre con el residuo W334 para TDP-43 (Cao et al., 2019), a menudo median interacciones de largo alcance. Por ello, existe la posibilidad de que el residuo W242 de la hélice  $\alpha$  A238-Q246 pueda participar en su estabilización (**Figura 5.2A y 5.2B**).



**Figura 5.2: Modelo de los cambios estructurales del PLD de hCPEB3 durante la consolidación de la memoria.** (A) Los 250 primeros residuos de hCPEB3 forman 4 hélices  $\alpha$  (azul) siendo la primera y la tercera relativamente estables. Los segmentos de prolina (verde) y la sumoilación (amarillo) previenen la asociación del segmento Q<sub>4</sub>RQ<sub>4</sub> (rojo) y el segmento hidrófobo (negro) y la formación de amiloide. (B) Tras la desumoilación y fosforilación mediada por la activación sináptica, la asociación entre la primera y la cuarta hélice  $\alpha$  podría verse reforzada por interacciones de largo alcance de tipo hidrófobo y catión- $\pi$ . El segmento Q<sub>4</sub>RQ<sub>4</sub> podría adoptar una estructura de hélice  $\alpha$  de mayor estabilidad y asociarse con las hélices  $\alpha$  ricas en residuos de alanina-serina para formar hélices superenrolladas que pueden cambiar su estructura adoptando la conformación de amiloide. (C) La estructura de amiloide estaría compuesta por el segmento Q<sub>4</sub>RQ<sub>4</sub>, una zona hidrófoba, y probablemente, el segmento rico en residuos de alanina. Por su parte, la configuración final que adoptan los segmentos de PPII (verde) podría promover la unión a la profilina y la formación de una red de actina más robusta.

Los conformeros que se han calculado para la NES demuestran que la conformación preferente es en forma de hélice  $\alpha$ , consta de 5 residuos hidrófobos situados en el mismo lado de la hélice  $\alpha$  y se trata de un motivo común encontrado en otras NESs (Xu et al., 2012). mCPEB3 experimenta ciclos de transporte entre

interior y el exterior del núcleo celular de forma continua y su localización subcelular es de vital importancia dado que también participa en la regulación de la transcripción de genes mediante su asociación con STAT5B en el núcleo de las neuronas, además de regular la traducción de ARNm en las espinas dendríticas (Ford et al., 2020). Otros trabajos anteriores han demostrado que la estimulación neuronal lleva a hCPEB3, que en estado basal se encuentra predominantemente en el citoplasma, a concentrarse en el núcleo (Chao et al., 2012), y que es la región que ocupa los residuos 639-700 de STAT5B la que se une al extremo N-terminal de la IDR de hCPEB3 (Peng et al., 2010). Para tratar de comprender mejor la naturaleza de esta interacción, se ha examinado la estructura recientemente elucidada de STAT5B (PDB: 6MBW) (de Araujo et al., 2019) destacando que los residuos que interactúan con hCPEB3 forman un dominio SH2.

Estas observaciones indican que hCPEB3 debería contener en su secuencia un residuo de tirosina fosforilable que fuese reconocido por STAT5B. Considerando los resultados sobre diferentes análisis de los motivos que recoge la bibliografía (Corwin et al., 2017; Liu et al., 2010), el sitio con mayor probabilidad para la modificación por fosforilación es el residuo Y341 debido a que se encuentra flanqueado por los residuos 338-SRPYDTF-344 que satisfacen los criterios de la secuencia sustrato consenso “[E/V/D]-[G]-[I/P/L]-Y-E-X-[F/T/V]” de Scr, una de las quinasas de tirosina más relevantes. A partir de estas observaciones sobre el sitio de fosforilación putativo y el descubrimiento de la conformación preferencial de la NES (L349-L353) en forma de hélice  $\alpha$ , se propone una hipótesis para explicar cómo la unión de STAT5B mantiene a hCPEB3 retenida en el núcleo. A través de la unión al residuo de fosfotirosina 341 mediante el dominio SH2 de STAT5B, la NES de hCPEB3 que se encuentra próxima, puede quedar oculta, evitando su reconocimiento por los factores de exportación al citoplasma. Esto podría explicar por qué hCPEB3 se concentra mayoritariamente en el núcleo en condiciones de estimulación neuronal (Chao et al., 2012). Estudios recientes han demostrado que ciertas mutaciones en las señales de exportación y localización nuclear o fallos en el transporte nucleo-citoplasmático de la TDP-43 dan lugar a la agregación aberrante de esta proteína (Gasset-Rosa et al., 2019). En este sentido, se propone que mutaciones en la NES de hCPEB3 podrían afectar probablemente al transporte nuclear dando lugar a déficits en los procesos de aprendizaje y memoria.

## VI. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos por RMN y la identificación de los elementos de secuencia que median la formación de amiloide en hCPEB3 (ver **Secciones 4.1 y 4.2.2 en Resultados**) han permitido proponer una hipótesis para el cambio conformacional experimentado por hCPEB3 durante el proceso de la consolidación de la memoria (**Figura 5.2**) que se apoya en resultados análogos obtenidos con ApCPEB (Raveendra et al., 2013) y otras expansiones de polialanina (Polling et al., 2015) para los que se han propuesto mecanismos similares.

Inicialmente, el PLD de hCPEB3 donde se encuentran los residuos que son necesarios y suficientes para la agregación y formación de amiloide (Fioriti et al., 2015), adoptaría una conformación mayoritariamente desplegada, a excepción de la hélice  $\alpha$  de mayor estabilidad formada por los residuos 222-234 y las hélices  $\alpha$  estructuradas parcialmente del extremo N-terminal y las formadas por los residuos 202-212 y 237-245 (**Figura 5.2A**). Así pues, el motivo Q<sub>4</sub>RQ<sub>4</sub> y el segmento hidrófobo 123-FFQGITPVNGTMLFQNF-139 se encontrarían inicialmente desordenados y con una capacidad para la formación de amiloide poco favorecida a causa de la presencia de motivos de prolina que la bloquean y la sumoilación del residuo de lisina del extremo N-terminal (Driscaldi et al., 2015).

Tras la desumoilación y la fosforilación de hCPEB3 que sigue a la estimulación neuronal, la asociación entre hélices  $\alpha$  se vería favorecida por las interacciones hidrófobas entre los residuos de M7 y W242 o las interacciones catión- $\pi$  entre K11 y el W242 (**Figura 5.2B**). El incremento en los niveles de hCPEB3 tras la estimulación neuronal (Fioriti et al., 2015) y la proximidad de la hélice  $\alpha$  rica en residuos de alanina de los residuos 222-234 podrían promover la formación de una hélice  $\alpha$  en los residuos Q<sub>4</sub>RQ<sub>4</sub> adoptando una conformación de hélices superenrolladas que son características de estas proteínas (Fiumara et al., 2010; Pelassa et al., 2014). Estos eventos reforzarían los contactos intermoleculares que ocurren en los gránulos neuronales de CPEB3 (Ford et al., 2019) y darían lugar a la gelificación, y finalmente, la formación de amiloide observadas *in vitro*. La estructura final del amiloide estaría constituida por el motivo Q<sub>4</sub>RQ<sub>4</sub> y el núcleo hidrófobo amiloidogénico. Específicamente, podrían ser los segmentos más polares 17-QQQQRQQQ-25, 106-SFGSTWSTGTTN-117, 136-FQQNF-140 y 236-SSASSSW NTHQS-247 los más propensos a adoptar una estructura en forma de espina  $\beta$

cruzada, o bien una estructura retorcida de menor estabilidad mediante interacciones dipolo-dipolo, catión- $\pi$  y  $\pi$ - $\pi$ , que sería clave para su función (Hughes et al., 2018).

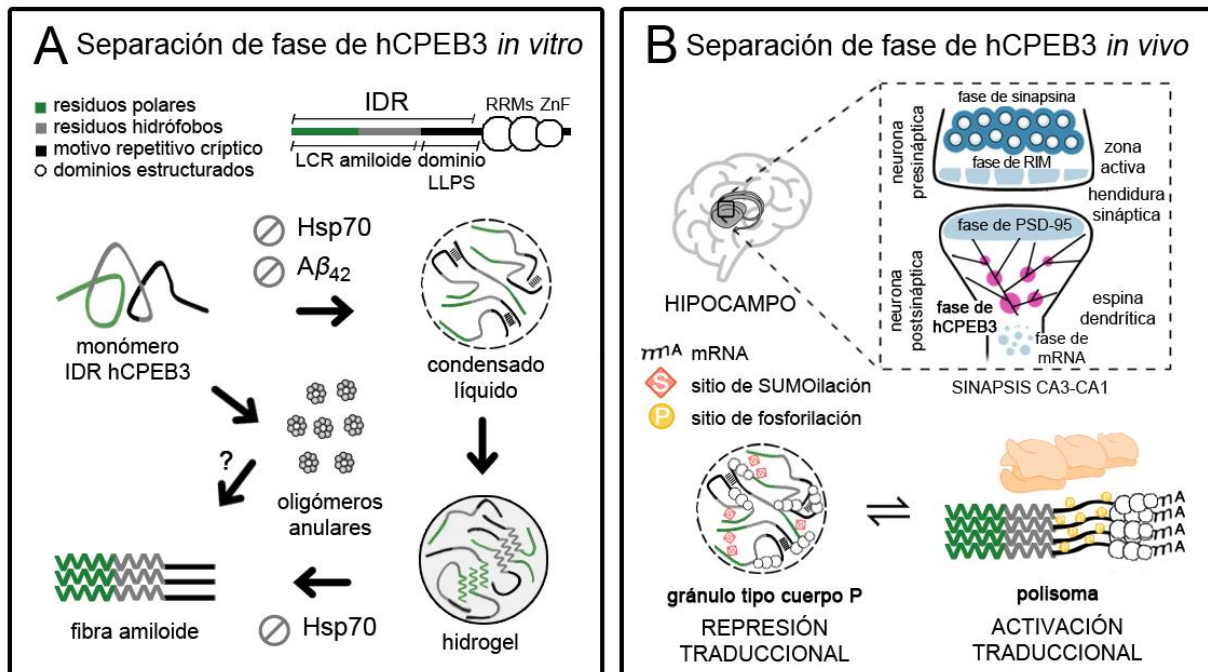
Además, es posible que el segmento de polialanina (residuos 202-212 y 222-234) también adopte una conformación de amiloide (**Figura 5.2C**). Este tipo de transición de estructura en forma de hélice  $\alpha$  a amiloide ha sido descrita previamente en polipéptidos ricos en residuos de alanina tan diversos como una proteína anticongelante en peces (Graether et al., 2003) o el hexadecapéptido sintético (Ala)<sub>10</sub>-(His)<sub>6</sub> (Hamley et al., 2014) y puede conducir a la formación de amiloides patológicos en varias enfermedades relacionadas con la expansión de segmentos de polialanina (Albrecht and Mundlos, 2005).

En esta tesis también se han identificado experimentalmente los elementos de secuencia clave para la separación de fases, la oligomerización y la agregación amiloide de la proteína hCPEB3 utilizando una estrategia de “divide y vencerás”. Estos resultados van en la misma dirección que otros datos obtenidos previamente para mCPEB3, en los que se demuestra que el PLD es esencial para su oligomerización y la formación de amiloide (**Figura 5.3A**) (Stephan et al., 2015). Además, también se ha evaluado la capacidad citotóxica de hCPEB3 *in vitro*, mostrando que comparte características biofísicas comunes con los amiloides patológicos, lo que sugiere que no existen diferencias estructurales entre ellos en términos de toxicidad celular.

En concreto, como se ha propuesto para otras proteínas como FUS (Patel et al., 2015) y TDP-43 (Gasset-Rosa et al., 2019), la condensación de hCPEB3 promueve el ensamblado de estructuras macromoleculares que disminuyen la energía de activación necesaria para la formación de especies citotóxicas. Por ello, la cascada amiloidogénica parece haber sido adaptada por las células a lo largo de la evolución para realizar determinadas funciones biológicas evitando la toxicidad celular intrínseca (Lasagna-Reeves et al., 2011). Los mecanismos que permiten a las células regular la formación de amiloides funcionales limitando la formación de especies oligoméricas tóxicas de larga vida media y la agregación amiloide patológica que acompaña a la separación de fases constituyen una cuestión clave que no se ha abordado en profundidad todavía (Chuang et al., 2018; Jackson and Hewitt, 2017). Teniendo en cuenta la conocida interacción entre las chaperonas y las IDPs

## VI. DISCUSIÓN

(Pechmann and Frydman, 2014), se ha estudiado el efecto de la chaperona Hsp70 en la formación de amiloide de hCPEB3. Los resultados obtenidos con la Hsp70, así como los de otros trabajos con la Hsp90 y CPEB2 (Tsvetkov et al., 2020) o la JJJ2 de *S. cerevisiae* (Li et al., 2016), parecen indicar que el sistema de chaperonas juega un papel fundamental en la regulación de la amiloidogénesis funcional (**Figura 5.3A**).



**Figura 5.3: Bases estructurales de la consolidación de la memoria mediada por hCPEB3. (A) *In vitro***, la IDR de hCPEB3 permanece estable en forma de monómero a 4 °C. Al incrementar la temperatura, se produce la LLPS debido a interacciones hidrófobas multivalentes entre residuos. Con el paso del tiempo, estas interacciones se estabilizan y la LSPT da lugar a la formación de hidrogel que “estalla” convirtiéndose en fibras de amiloide formadas cooperativamente por interacciones entre los segmentos de poliglutamina y polialanina de la LCR que pueden ser bloqueadas por QBP1 y Aβ<sub>42</sub> respectivamente. La condensación de hCPEB3 es acompañada de la formación de oligómeros anulares metaestables y citotóxicos. **(B) *In vivo***, la consolidación de la memoria ocurre a nivel de la sinapsis en el hipocampo a través de la síntesis local de proteínas. En el estado basal, hCPEB3 se encuentra sumoiloado en forma de gránulos neuronales en estado latente que reprimen la traducción del ARNm que regula la plasticidad sináptica. Tras la estimulación neuronal, la sumoilación de hCPEB3 disminuye y la fosforilación en la región que media la LLPS aumenta. La conversión de hCPEB3 a una forma amiloide activa da lugar a la traducción del ARNm en proteínas que median la potenciación a largo plazo y la consolidación de la memoria.

También se han aportado evidencias de que, a diferencia de lo que ocurre para otras proteínas como FUS o TDP-43, el PLD no es indispensable para la separación de fases de hCPEB3. Por otra parte, los RRM son requeridos para su localización y

estabilización celular en forma de gránulos. Así pues, parece que las IDPs pueden formar ensamblados macromoleculares con diferentes propiedades estructurales de acuerdo a la contribución de cada uno de los dominios que las constituyen (Boyko et al., 2019; Ford et al., 2019). En este sentido, se ha demostrado que los RRM de proteínas de unión a ARN como TDP-43 o FUS pueden contribuir adicionalmente a la formación de amiloide de estas proteínas (Agrawal et al., 2019). Estas observaciones contrastan con el hecho de que el ARN previene la formación de condensados biomoleculares para estas proteínas (Maharana et al., 2018).

Los componentes de los condensados biomoleculares pueden dividirse en dos clases cualitativas en relación a su tendencia a condensar; de andamiaje o clientes (Banani et al., 2017). Se ha demostrado en este trabajo que hCPEB3 condensa espontáneamente en condiciones fisiológicas, lo que pone de manifiesto su capacidad como proteína de andamiaje para la formación de gránulos de ARN específicos que participan en el transporte y represión del ARNm asociado a la regulación de la consolidación de la memoria. Este hecho contrasta con el aparente papel como cliente recientemente propuesto para mCPEB3 (Ford et al., 2019).

Los resultados de esta tesis apoyan la idea de que la separación de fases puede ser modulada por acción de distintos agentes moleculares, una observación que podría ser relevante a la hora de considerar esta propiedad de las proteínas como una posible diana terapéutica de intervención farmacológica. Particularmente, se ha demostrado que el amiloide  $A\beta_{42}$  inhibe *in vitro* la condensación de hCPEB3 (**Figura 5.3A**). Este hecho sugiere que hCPEB3 podría quedar atrapado en agregados patológicos al comienzo de la enfermedad de Alzheimer, impidiendo la regulación de la traducción normal de ARNm que media hCPEB3 y dando lugar a los déficits de memoria que aparecen antes de la neurodegeneración. Análogamente, se ha visto que los agregados de huntingtina con expansiones de glutamina son capaces de atrapar a Orb2 (Hervás et al., 2016) reduciendo la traducción de ARNm. Estos resultados han dado lugar a propuestas similares que refuerzan esta hipótesis (Joag et al., 2019).

La LLPS de hCPEB3 también puede ser regulada por acción de la Hsp70 que es capaz de inhibir la formación de condensados líquidos de forma pasiva. Curiosamente, la Hsp70 posee dos LCRs intrínsecamente desordenados con un

## VI. DISCUSIÓN

contenido notable de residuos hidrófobos entre los residuos 365-409 y 611-641 (Chakafana et al., 2019). Teniendo en cuenta estas observaciones, se sugiere que estos segmentos de baja complejidad, en lugar de su dominio C-terminal de unión a sustrato, son los responsables de prevenir la separación de fases de hCPEB3.

Por otro parte, se ha descrito que la fosforilación de residuos de serina puede regular la formación y disociación de condensados biomoleculares en proteínas como FUS, cuya organización de dominios y función comparte algunas similitudes con hCPEB3 (Monahan et al., 2017). Dado que los sitios de fosforilación de la IDR de hCPEB3 se sitúan en la región que se separa de fase, se propone que la fosforilación de los residuos de serina podría regular la LLPS de hCPEB3.

La presencia de segmentos con puntos LCST y UCST locales en la secuencia de hCPEB3 refuerza la idea de que ciertas IDPs con tendencia a la LLPS pueden ser descritas como copolímeros en bloque de forma similar a lo observado para el caso de tau (Boyko et al., 2019). Por ello, se propone que diferentes segmentos de hCPEB3, podrían interactuar con distintos tipos de condensados biomoleculares de acuerdo a las funciones específicas de esta proteína en la célula. También se ha demostrado en esta tesis como el balance en la proporción de residuos hidrófobos y polares modula las propiedades líquidas de los condensados de la IDR de hCPEB3 permite sentar las bases para la compresión de la “gramática molecular” que gobierna tanto la condensación de hCPEB3 de forma global, como la formación local de la estructura de amiloide en términos de secuencia y composición.

Por último, combinando resultados de esta tesis y otros estudios previos, se propone un modelo integrado para el papel de hCPEB3 en la consolidación de la memoria que relaciona las transiciones estructurales identificadas en este trabajo con su función neuronal. En el estado basal, la sumoilación de hCPEB3 mantiene inhibida la formación de amiloide del PLD (Driscaldi et al., 2015) y el ARNm unido a hCPEB3 es traduccionalmente reprimido en los gránulos neuronales, similares a los cuerpos de procesamiento (Ford et al., 2019), cuya formación está dirigida por la IDR que media la LLPS, especialmente por las secuencias localizadas en su zona C-terminal **(Figura 5.3A y 5.3B)**.

Tras la estimulación neuronal, la activación de quinasas específicas neuronales que fosforilan el dominio que media la LLPS de hCPEB3 daría lugar a la



disolución de los gránulos neuronales quedando el ARNm accesible a los polisomas (Giese and Mizuno, 2013; Kaczmarczyk et al., 2016). Una vez que hCPEB3 es desumoilada, el PLD adoptaría una estructura de amiloide activa mediante interacciones entre los segmentos de poliglutamina y polialanina que desencadenarían la traducción del ARNm de proteínas que regulan la plasticidad sináptica permitiendo que tenga lugar la formación de nuevas memorias en el hipocampo (**Figura 5.3B**) (Hervás et al., 2020a).

**Parte VI**  
**CONCLUSIONES**

## VI. CONCLUSIONES

---

A continuación, se enumeran las conclusiones más relevantes obtenidas del trabajo de esta tesis doctoral:

- (1). El estudio mediante RMN en disolución del prionoide hCPEB3 ha permitido identificar que, en el estado de monómero, el extremo N-terminal presenta un motivo de hélice  $\alpha$  anfipática seguida de un segmento de poliglutamina desordenado y flexible característico de las proteínas formadoras de amiloide.
- (2). La región intrínsecamente desordenada de hCPEB3 contiene cuatro hélices  $\alpha$  parcialmente estructuradas y un segmento rígido de carácter hidrófobo que participan en la formación de amiloide *in vitro*.
- (3). Se han identificado en hCPEB3 los valores de desplazamientos químicos conformacionales para la identificación de la estructura de hélice PPII. La presencia en el dominio prionoide de residuos como la prolina, que son capaces de bloquear la amiloidogénesis, constituye una diferencia fundamental entre amiloides funcionales y patológicos.
- (4). La señal de exportación nuclear de hCPEB3 adopta una conformación de hélice  $\alpha$  próxima a un residuo de tirosina localizado en una secuencia consenso de fosforilación que regula el transporte nucleocitoplasmático de hCPEB3 a través de su unión con la proteína STAT5B.
- (5). La separación de fases líquido-líquido está dirigida por interacciones hidrófobas multivalentes entre residuos de la zona C-terminal de la región intrínsecamente desordenada de hCPEB3. En células neuronales, estos condensados biomoleculares son dinámicos y su estabilización y localización celular está mediada por los dominios de reconocimiento de ARN.
- (6). El péptido inhibidor QBP1, la chaperona Hsp70 y el amiloide  $A\beta_{42}$  son capaces de bloquear la amiloidogénesis del dominio prionoide de hCPEB3 *in vitro*, demostrando que las zonas ricas en residuos de glutamina e hidrófobos son requeridas para la formación de amiloide funcional.
- (7). La estabilidad temporal de los oligómeros tóxicos de hCPEB3 no es transitoria como ocurre para otros amiloides funcionales y refleja las similitudes estructurales que existen entre los amiloides funcionales y patológicos. Por ello, existen mecanismos adicionales que permitan a las células regular su toxicidad.
- (8). Estos descubrimientos han permitido establecer un modelo que relaciona las transiciones estructurales que experimenta hCPEB3 con su función en el proceso de la consolidación de la memoria en la especie humana.

**Parte VII**  
**BIBLIOGRAFÍA**

## VII. BIBLIOGRAFÍA

---

- Abisambra, J., Jinwal, U.K., Miyata, Y., Rogers, J., Blair, L., Li, X., Seguin, S.P., Wang, L., Jin, Y., Bacon, J., et al. (2013). Allosteric heat shock protein 70 inhibitors rapidly rescue synaptic plasticity deficits by reducing aberrant tau. *Biol. Psychiatry* *74*, 367–374.
- Afroz, T., Skrisovska, L., Belloc, E., Guillén-Boixet, J., Méndez, R., and Allain, F.H.T. (2014). A fly trap mechanism provides sequence-specific RNA recognition by CPEB proteins. *Genes Dev.* *28*, 1498–1514.
- Agrawal, S., Kuo, P.H., Chu, L.Y., Golzarroshan, B., Jain, M., and Yuan, H.S. (2019). RNA recognition motifs of disease-linked RNA-binding proteins contribute to amyloid formation. *Sci. Rep.* *9*, 6171.
- Aguzzi, A., and Altmeyer, M. (2016). Phase separation: Linking cellular compartmentalization to disease. *Trends Cell Biol.* *26*, 547–558.
- Alarcon, J.M., Hodgman, R., Theis, M., Huang, Y.S., Kandel, E.R., and Richter, J.D. (2004). Selective modulation of some forms of Schaffer collateral-CA1 synaptic plasticity in mice with a disruption of the CPEB-1 gene. *Learn. Mem.* *11*, 318–327.
- Alberti, S., Halfmann, R., King, O., Kapila, A., and Lindquist, S. (2009). A systematic survey identifies prions and illuminates sequence features of prionogenic proteins. *Cell* *137*, 146–158.
- Alberti, S., Gladfelter, A., and Mittag, T. (2019). Considerations and challenges in studying liquid-liquid phase separation and biomolecular condensates. *Cell* *176*, 419–434.
- Albrecht, A., and Mundlos, S. (2005). The other trinucleotide repeat: Polyalanine expansion disorders. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *15*, 285–293.
- Alenquer, M., Vale-Costa, S., Etibor, T.A., Ferreira, F., Sousa, A.L., and Amorim, M.J. (2019). Influenza A virus ribonucleoproteins form liquid organelles at endoplasmic reticulum exit sites. *Nat. Commun.* *10*, 1–19.
- Alexandrov, I.M., Ivshina, M., Jung, D.Y., Friedline, R., Ko, H.J., Xu, M., O’Sullivan-Murphy, B., Bortell, R., Huang, Y.T., Urano, F., et al. (2012). Cytoplasmic polyadenylation element binding protein deficiency stimulates PTEN and Stat3 mRNA translation and induces hepatic insulin resistance. *PLoS Genet.* *8*, e1002457.
- Alston, R.W., Urbanikova, L., Sevcik, J., Lasagna, M., Reinhart, G.D., Scholtz, J.M., and Pace, C.N. (2004). Contribution of single tryptophan residues to the fluorescence and stability of ribonuclease Sa. *Biophys. J.* *87*, 4036–4047.
- Ambadipudi, S., Biernat, J., Riedel, D., Mandelkow, E., and Zweckstetter, M. (2017). Liquid-liquid phase separation of the microtubule-binding repeats of the Alzheimer-related protein Tau. *Nat. Commun.* *8*, 275.
- Anfinsen, C.B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science* *181*, 223–230.
- Antonets, K.S., and Nizhnikov, A.A. (2017). Amyloids and prions in plants: Facts and perspectives. *Prion* *11*, 300–312.
- Antonicka, H., Sasarman, F., Nishimura, T., Paupe, V., and Shoubbridge, E.A. (2013). The mitochondrial RNA-binding protein GRSF1 localizes to RNA granules and is required for posttranscriptional mitochondrial gene expression. *Cell Metab.* *17*, 386–398.
- de Araujo, E.D., Erdogan, F., Neubauer, H.A., Meneksedag-Erol, D., Manaswiyoungkul, P.,

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Eram, M.S., Seo, H.S., Qadree, A.K., Israelian, J., Orlova, A., et al. (2019). Structural and functional consequences of the STAT5BN642H driver mutation. *Nat. Commun.* 10, 2517.
- Audas, T.E., Audas, D.E., Jacob, M.D., Ho, J.J.D., Khacho, M., Wang, M., Perera, J.K., Gardiner, C., Bennett, C.A., Head, T., et al. (2016). Adaptation to stressors by systemic protein amyloidogenesis. *Dev. Cell* 39, 155–168.
- Aurora, R., and Rose, G.D. (1998). Helix capping. *Protein Sci.* 7, 21–38.
- Bagatolli, L.A. (2016). Fluorescence spectroscopy: Basic foundations and methods. In Müllertz A., Perrie Y., Rades T. (Eds) *Analytical Techniques in the Pharmaceutical Sciences. Advances in Delivery Science and Technology.*, (Springer, New York, NY), pp. 29–59.
- Banani, S.F., Rice, A.M., Peeples, W.B., Lin, Y., Jain, S., Parker, R., and Rosen, M.K. (2016). Compositional control of phase-separated cellular bodies. *Cell* 166, 651–663.
- Banani, S.F., Lee, H.O., Hyman, A.A., and Rosen, M.K. (2017). Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 285–298.
- Banfi, S., Servadio, A., Chung, M. yi, Kwiatkowski, T.J., McCall, A.E., Duvick, L.A., Shen, Y., Roth, E.J., Orr, H.T., and Zoghbi, H.Y. (1994). Identification and characterization of the gene causing type 1 spinocerebellar ataxia. *Nat. Genet.* 7, 513–520.
- Bartolini, M., Naldi, M., Fiori, J., Valle, F., Biscarini, F., Nicolau, D. V., and Andrisano, V. (2011). Kinetic characterization of amyloid-beta 1-42 aggregation with a multimethodological approach. *Anal. Biochem.* 414, 215–225.
- Basu, S., and Lamprecht, R. (2018). The role of actin cytoskeleton in dendritic spines in the maintenance of long-term memory. *Front. Mol. Neurosci.* 11, 143.
- Behl, C., Davis, J.B., Klier, F.G., and Schubert, D. (1994). Amyloid beta peptide induces necrosis rather than apoptosis. *Brain Res.* 645, 253–264.
- Belloc, E., Piqué, M., and Méndez, R. (2008). Sequential waves of polyadenylation and deadenylation define a translation circuit that drives meiotic progression. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 665–670.
- Benilova, I., Karran, E., and De Strooper, B. (2012). The toxic A $\beta$  oligomer and Alzheimer's disease: An emperor in need of clothes. *Nat. Neurosci.* 15, 349–357.
- Berger-Sweeney, J., Zearfoss, N.R., and Richter, J.D. (2006). Reduced extinction of hippocampal-dependent memories in CPEB knockout mice. *Learn. Mem.* 13, 4–7.
- Bergeron-Sandoval, L.-P., Khadivi Heris, H., Chang, C., Keller, S.L., François, P., Hendricks, A.G., Ehrlicher, A.J., and Michnick, S.W. (2017). Endocytosis caused by liquid-liquid phase separation of proteins. *BioRxiv* <https://doi.org/10.1101/145664>.
- Berthelot, K., Lecomte, S., Estevez, Y., Coulary-Salin, B., Bentaleb, A., Cullin, C., Deffieux, A., and Peruch, F. (2012). Rubber elongation factor (REF), a major allergen component in *Hevea brasiliensis* latex has amyloid properties. *PLoS One* 7, e48065.
- Bestman, J.E., and Cline, H.T. (2008). The RNA binding protein CPEB regulates dendrite morphogenesis and neuronal circuit assembly in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 20494–20499.
- Bhattacharyya, A., Thakur, A.K., Chellgren, V.M., Thiagarajan, G., Williams, A.D., Chellgren, B.W., Creamer, T.P., and Wetzel, R. (2006). Oligoproline effects on polyglutamine conformation and aggregation. *J. Mol. Biol.* 355, 524–535.
- Bieler, S., Estrada, L., Lagos, R., Baeza, M., Castilla, J., and Soto, C. (2005). Amyloid formation modulates the biological activity of a bacterial protein. *J. Biol. Chem.* 280, 26880–

26885.

- Biessels, G.J., Staekenborg, S., Brunner, E., Brayne, C., and Scheltens, P. (2006). Risk of dementia in diabetes mellitus: A systematic review. *Lancet Neurol.* 5, 64–74.
- Blanco, L.P., Evans, M.L., Smith, D.R., Badtke, M.P., and Chapman, M.R. (2012). Diversity, biogenesis and function of microbial amyloids. *Trends Microbiol.* 20, 66–73.
- Blum, E.S., Schwendeman, A.R., and Shaham, S. (2013). PolyQ disease: Misfiring of a developmental cell death program? *Trends Cell Biol.* 23, 168–174.
- Bodenhausen, G., and Ruben, D.J. (1980). Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* 69, 185–189.
- Boke, E., Ruer, M., Wühr, M., Coughlin, M., Lemaitre, R., Gygi, S.P., Alberti, S., Drechsel, D., Hyman, A.A., and Mitchison, T.J. (2016). Amyloid-like Self-Assembly of a Cellular Compartment. *Cell* 166, 637–650.
- Boyko, S., Qi, X., Chen, T.H., Surewicz, K., and Surewicz, W.K. (2019). Liquid-liquid phase separation of tau protein: The crucial role of electrostatic interactions. *J. Biol. Chem.* 294, 11054–11059.
- Brachmann, A., Baxa, U., and Wickner, R.B. (2005). Prion generation in vitro: Amyloid of Ure2p is infectious. *EMBO J.* 24, 3082–3092.
- Brahms, S., and Brahms, J. (1980). Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *J. Mol. Biol.* 138, 149–178.
- Brangwynne, C.P., Eckmann, C.R., Courson, D.S., Rybarska, A., Hoege, C., Gharakhani, J., Jülicher, F., and Hyman, A.A. (2009). Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation. *Science* 324, 1729–1732.
- Brangwynne, C.P., Tompa, P., and Pappu, R. V. (2015). Polymer physics of intracellular phase transitions. *Nat. Phys.* 11, 899–904.
- Braunschweiler, L., and Ernst, R.R. (1983). Coherence transfer by isotropic mixing: Application to proton correlation spectroscopy. *J. Magn. Reson.* 53, 521–528.
- Brown, C.J., Takayama, S., Campen, A.M., Vise, P., Marshall, T.W., Oldfield, C.J., Williams, C.J., and Keith Dunker, A. (2002). Evolutionary rate heterogeneity in proteins with long disordered regions. *J. Mol. Evol.* 55, 104–110.
- Brown, C.J., Johnson, A.K., and Daughdrill, G.W. (2010). Comparing models of evolution for ordered and disordered proteins. *Mol. Biol. Evol.* 27, 609–621.
- Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C.M., and Stefani, M. (2002). Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature* 416, 507–511.
- Bucciantini, M., Calloni, G., Chiti, F., Formigli, L., Nosi, D., Dobson, C.M., and Stefani, M. (2004). Prefibrillar amyloid protein aggregates share common features of cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 279, 31374–31382.
- Bundi, A., and Wüthrich, K. (1979). <sup>1</sup>H-NMR parameters of the common amino acid residues measured in aqueous solutions of the linear tetrapeptides H-Gly-Gly-X-Ala-OH. *Biopolymers* 18, 285–297.
- Cao, Q., Boyer, D.R., Sawaya, M.R., Ge, P., and Eisenberg, D.S. (2019). Cryo-EM structures of four polymorphic TDP-43 amyloid cores. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 26, 619–627.
- Cascarina, S.M., and Ross, E.D. (2014). Yeast prions and human prion-like proteins: sequence features and prediction methods. *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 2047–2063.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Cervantes, S.A., Bajakian, T.H., Soria, M.A., Falk, A.S., Service, R.J., Langen, R., and Siemer, A.B. (2016). Identification and structural characterization of the N-terminal amyloid core of Orb2 isoform A. *Sci. Rep.* 6, 38265.
- Chae, Y.-S., Lee, S.-H., Cheang, Y.-H., Lee, N., Rim, Y.-S., Jang, D.-J., and Kaang, B.-K. (2010). Neuronal RNA granule contains ApCPEB1, a novel cytoplasmic polyadenylation element binding protein, in *Aplysia* sensory neuron. *Exp. Mol. Med.* 42, 30–37.
- Chakafana, Zininga, and Shonhai (2019). The link that binds: The linker of Hsp70 as a helm of the protein's function. *Biomolecules* 9, 543.
- Chakrabartty, A., and Baldwin, R.L. (1995). Stability of alpha-helices. *Adv Protein Chem.* 46, 141–176.
- Chakrabartty, A., Kortemme, T., and Baldwin, R.L. (1994). Helix propensities of the amino acids measured in alanine-based peptides without helix-stabilizing side-chain interactions. *Protein Sci.* 3, 843–852.
- Chan, C.X.J., and Lipke, P.N. (2014). Role of force-sensitive amyloid-like interactions in fungal catch bonding and biofilms. *Eukaryot. Cell* 13, 1136–1142.
- Chan, C.X.J., El-Kirat-Chatel, S., Joseph, I.G., Jackson, D.N., Ramsook, C.B., Dufrière, Y.F., and Lipke, P.N. (2016). Force sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae* flocculins. *MSphere* 1, e00128.
- Chao, H.-W., Lai, Y.-T., Lu, Y.-L., Lin, C., Mai, W., and Huang, Y.-S. (2012). NMDAR signaling facilitates the IPO5-mediated nuclear import of CPEB3. *Nucleic Acids Res.* 40, 8484–8498.
- Chao, H.W., Tsai, L.Y., Lu, Y.L., Lin, P.Y., Huang, W.H., Chou, H.J., Lu, W.H., Lin, H.C., Lee, P.T., and Huang, Y.S. (2013). Deletion of CPEB3 enhances hippocampus-dependent memory via increasing expressions of PSD95 and NMDA receptors. *J. Neurosci.* 33, 17008–17022.
- Chavali, S., Singh, A.K., Santhanam, B., and Babu, M.M. (2020). Amino acid homorepeats in proteins. *Nat. Rev. Chem.* 4, 420–434.
- Chemes, L.B., Alonso, L.G., Noval, M.G., and De Prat-Gay, G. (2012). Circular dichroism techniques for the analysis of intrinsically disordered proteins and domains. *Methods Mol. Biol.* 895, 387–404.
- Chen, S.W., Drakulic, S., Deas, E., Ouberai, M., Aprile, F.A., Arranz, R., Ness, S., Roodveldt, C., Williams, T., De-Genst, E.J., et al. (2015). Structural characterization of toxic oligomers that are kinetically trapped during  $\alpha$ -synuclein fibril formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E1994-2003.
- Cheng, B., Gong, H., Xiao, H., Petersen, R.B., Zheng, L., and Huang, K. (2013). Inhibiting toxic aggregation of amyloidogenic proteins: A therapeutic strategy for protein misfolding diseases. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1830, 4860–4871.
- Choi, Y.B., Kadakkuzha, B.M., Liu, X.A., Akhmedov, K., Kandel, E.R., and Puthanveetil, S. V. (2014). Huntingtin is critical both pre- and postsynaptically for long-term learning-related synaptic plasticity in *Aplysia*. *PLoS One* 9, e103004.
- Chong, P.A., Vernon, R.M., and Forman-Kay, J.D. (2018). RGG/RG motif regions in RNA binding and phase separation. *J. Mol. Biol.* 430, 4650–4665.
- Chuang, E., Hori, A.M., Hesketh, C.D., and Shorter, J. (2018). Amyloid assembly and disassembly. *J. Cell Sci.* 131, jcs189928.
- Clerico, E.M., Tilitsky, J.M., Meng, W., and Gierasch, L.M. (2015). How Hsp70 molecular



machines interact with their substrates to mediate diverse physiological functions. *J. Mol. Biol.* **427**, 1575–1588.

Conicella, A.E., Zerze, G.H., Mittal, J., and Fawzi, N.L. (2016). ALS mutations disrupt phase separation mediated by  $\alpha$ -helical structure in the TDP-43 low-complexity C-terminal domain. *Structure* **24**, 1537–1549.

Corwin, T., Woodsmith, J., Apelt, F., Fontaine, J.F., Meierhofer, D., Helmuth, J., Grossmann, A., Andrade-Navarro, M.A., Ballif, B.A., and Stelzl, U. (2017). Defining human tyrosine kinase phosphorylation networks using yeast as an in vivo model substrate. *Cell Syst.* **5**, 128-139.e4.

Couthouisa, J., Harta, M.P., Shorter, J., DeJesus-Hernandez, M., Erion, R., Oristano, R., Liu, A.X., Ramos, D., Jethava, N., Hosangadi, D., et al. (2011). A yeast functional screen predicts new candidate ALS disease genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 20881–20890.

Crick, F. (1984). Neurobiology: Memory and molecular turnover. *Nature* **312**, 101.

van Dam, L., and Dansen, T.B. (2020). Cross-talk between redox signalling and protein aggregation. *Biochem. Soc. Trans.* **48**, 379–397.

Darling, A.L., and Uversky, V.N. (2017). Intrinsic disorder in proteins with pathogenic repeat expansions. *Molecules* **22**, 2027.

Daughdrill, G.W., Pielak, G.J., Uversky, V.N., Cortese, M.S., and Dunker, A.K. (2005). Natively disordered proteins. In Buchner J., Kiefhaber T. (Eds) *Handbook of Protein Folding*. Vol 2., (Wiley-VCH), pp. 275–357.

Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G.W., Zhu, G., Pfeifer, J., and Bax, A. (1995). NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR* **6**, 277–293.

Denning, D.P., Patel, S.S., Uversky, V., Fink, A.L., and Rexach, M. (2003). Disorder in the nuclear pore complex: The FG repeat regions of nucleoporins are natively unfolded. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 2450–2455.

Díaz-Caballero, M., Rosario Fernández, M., Navarro, S., and Ventura, S. (2018). Prion-based nanomaterials and their emerging applications. *Prion* **12**, 266–272.

Diez-García, F., Gómez-Pinto, I., Chakrabarty, A., González, C., and Laurents, D. V. (2012). Conformation specificity and arene binding in a peptide composed only of Lys, Ile, Ala and Gly. *Eur. Biophys. J.* **41**, 63–72.

Dosztányi, Z., Csizmok, V., Tompa, P., and Simon, I. (2005). IUPred. *Bioinformatics* **21**, 3433–3434.

Drisaldi, B., Colnaghi, L., Fioriti, L., Rao, N., Myers, C., Snyder, A.M., Metzger, D.J., Tarasoff, J., Konstantinov, E., Fraser, P.E., et al. (2015). SUMOylation Is an Inhibitory Constraint that Regulates the Prion-like Aggregation and Activity of CPEB3. *Cell Rep.* **11**, 1694–1702.

Du, Z. (2011). The complexity and implications of yeast prion domains. *Prion* **5**, 311–316.

Du, Z., Park, K.W., Yu, H., Fan, Q., and Li, L. (2008). Newly identified prion linked to the chromatin-remodeling factor Swi1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Genet.* **40**, 460–465.

Dueholm, M.S., Larsen, P., Finster, K., Stenvang, M.R., Christiansen, G., Vad, B.S., Bøggild, A., Otzen, D.E., and Nielsen, P.H. (2015). The tubular sheaths encasing *Methanosaeta thermophila* filaments are functional amyloids. *J. Biol. Chem.* **290**, 20590–20600.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Dunker, A.K., Obradovic, Z., Romero, P., Garner, E.C., and Brown, C.J. (2000). Intrinsic protein disorder in complete genomes. *Genome Inform. Ser. Workshop Genome Inform.* 11, 161–171.
- Eftekhazadeh, B., Piai, A., Chiesa, G., Mungianu, D., García, J., Pierattelli, R., Felli, I.C., and Salvatella, X. (2016). Sequence context influences the structure and aggregation behavior of a polyQ tract. *Biophys. J.* 110, 2361–2366.
- Eisele, Y.S., Monteiro, C., Fearn, C., Encalada, S.E., Wiseman, R.L., Powers, E.T., and Kelly, J.W. (2015). Targeting protein aggregation for the treatment of degenerative diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14, 759–780.
- Escobedo, A., Topal, B., Kunze, M.B.A., Aranda, J., Chiesa, G., Mungianu, D., Bernardo-Seisdedos, G., Eftekhazadeh, B., Gairí, M., Pierattelli, R., et al. (2019). Side chain to main chain hydrogen bonds stabilize a polyglutamine helix in a transcription factor. *Nat. Commun.* 10, 1–11.
- Fändrich, M., Fletcher, M.A., and Dobson, C.M. (2001). Amyloid fibrils from muscle myoglobin. Even an ordinary globular protein can assume a rogue guise if conditions are right. *Nature* 410, 165–166.
- Fang, Y.S., Tsai, K.J., Chang, Y.J., Kao, P., Woods, R., Kuo, P.H., Wu, C.C., Liao, J.Y., Chou, S.C., Lin, V., et al. (2014). Full-length TDP-43 forms toxic amyloid oligomers that are present in frontotemporal lobar dementia-TDP patients. *Nat. Commun.* 5, 4824.
- Feric, M., Vaidya, N., Harmon, T.S., Mitrea, D.M., Zhu, L., Richardson, T.M., Kriwacki, R.W., Pappu, R. V., and Brangwynne, C.P. (2016). Coexisting liquid phases underlie nucleolar subcompartments. *Cell* 165, 1686–1697.
- Fernández-Miranda, G., and Méndez, R. (2012). The CPEB-family of proteins, translational control in senescence and cancer. *Ageing Res. Rev.* 11, 460–472.
- Fernandez, C., Nuñez-Ramirez, R., Jimenez, M., Rivas, G., and Giraldo, R. (2016). RepA-WH1, the agent of an amyloid proteinopathy in bacteria, builds oligomeric pores through lipid vesicles. *Sci. Rep.* 6, 23144.
- Ferron, F., Rebowski, G., Lee, S.H., and Dominguez, R. (2007). Structural basis for the recruitment of profilin-actin complexes during filament elongation by Ena/VASP. *EMBO J.* 26, 4597–4606.
- Fioriti, L., Myers, C., Huang, Y.-Y., Li, X., Stephan, J.S., Trifilieff, P., Colnaghi, L., Kosmidis, S., Drisaldi, B., Pavlopoulos, E., et al. (2015). The persistence of hippocampal-based memory requires protein synthesis mediated by the prion-like protein CPEB3. *Neuron* 86, 1433–1448.
- Fischer, E. (1894). Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Berichte Der Dtsch. Chem. Gesellschaft* 27, 2985–2993.
- Fiumara, F., Fioriti, L., Kandel, E.R., and Hendrickson, W.A. (2010). Essential role of coiled coils for aggregation and activity of Q/N-rich prions and polyQ proteins. *Cell* 143, 1121–1135.
- Fiumara, F., Rajasethupathy, P., Antonov, I., Kosmidis, S., Sossin, W.S., and Kandel, E.R. (2015). MicroRNA-22 gates long-term heterosynaptic plasticity in *Aplysia* through presynaptic regulation of CPEB and downstream targets. *Cell Rep.* 11, 1866–1875.
- Ford, L., Ling, E., Kandel, E.R., and Fioriti, L. (2019). CPEB3 inhibits translation of mRNA targets by localizing them to P bodies. *Cell* 116, 18078–18087.
- Ford, L., Asok, A., Tripp, A.D., Parro, C., Fitzpatrick, M., Solis, C.A. de, Shafii, N., Fioriti,

- L., Soni, R.K., and Kandel, E.R. (2020). The low complexity motif of cytoplasmic polyadenylation element binding protein 3 (CPEB3) is critical for the trafficking of its targets in neurons. *BioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2020.05.16.100032>.
- Fowler, D.M., Koulov, A. V, Alory-Jost, C., Marks, M.S., Balch, W.E., and Kelly, J.W. (2005). Functional amyloid formation within mammalian tissue. *PLoS Biol.* *4*, e6.
- Franzmann, T.M., and Alberti, S. (2019). Prion-like low-complexity sequences: Key regulators of protein solubility and phase behavior. *J. Biol. Chem.* *294*, 7128–7136.
- Franzmann, T.M., Jahnel, M., Pozniakovsky, A., Mahamid, J., Holehouse, A.S., Nüske, E., Richter, D., Baumeister, W., Grill, S.W., Pappu, R. V, et al. (2018). Phase separation of a yeast prion protein promotes cellular fitness. *Science* *359*, eaao5654.
- Freeman Rosenzweig, E.S., Xu, B., Kuhn Cuellar, L., Martinez-Sanchez, A., Schaffer, M., Strauss, M., Cartwright, H.N., Ronceray, P., Pitzko, J.M., Förster, F., et al. (2017). The eukaryotic CO<sub>2</sub>-concentrating organelle is liquid-like and exhibits dynamic reorganization. *Cell* *171*, 148-162.e19.
- Frey, S., Richter, R.P., and Görlich, D. (2006). FG-rich repeats of nuclear pore proteins form a three-dimensional meshwork with hydrogel-like properties. *Science* *314*, 815–817.
- Fu, X.D. (1995). The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors. *RNA* *1*, 663–680.
- Fusco, G., Chen, S.W., Williamson, P.T.F., Cascella, R., Perni, M., Jarvis, J.A., Cecchi, C., Vendruscolo, M., Chiti, F., Cremades, N., et al. (2017). Structural basis of membrane disruption and cellular toxicity by a-synuclein oligomers. *Science* *358*, 1440–1443.
- Fuxreiter, M. (2018). Fuzziness in protein interactions-A historical perspective. *J. Mol. Biol.* *430*, 2278–2287.
- Garvey, M., Meehan, S., Gras, S.L., Schirra, H.J., Craik, D.J., Van Der Weerden, N.L., Anderson, M.A., Gerrard, J.A., and Carver, J.A. (2013). A radish seed antifungal peptide with a high amyloid fibril-forming propensity. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* *1834*, 1615–1623.
- Gasset-Rosa, F., Lu, S., Yu, H., Chen, C., Melamed, Z., Guo, L., Shorter, J., Da Cruz, S., and Cleveland, D.W. (2019). Cytoplasmic TDP-43 de-mixing independent of stress granules drives inhibition of nuclear import, loss of nuclear TDP-43, and cell death. *Neuron* *102*, 339-357.e7.
- Van Gerven, N., Van der Verren, S.E., Reiter, D.M., and Remaut, H. (2018). The role of functional amyloids in bacterial virulence. *J. Mol. Biol.* *430*, 3657–3684.
- Ghosh, S., Salot, S., Sengupta, S., Navalkar, A., Ghosh, D., Jacob, R., Das, S., Kumar, R., Jha, N.N., Sahay, S., et al. (2017). P53 amyloid formation leading to its loss of function: Implications in cancer pathogenesis. *Cell Death Differ.* *24*, 1784–1798.
- Giangarrà, V., Igea, A., Castellazzi, C.L., Bava, F.A., and Mendez, R. (2015). Global analysis of CPEBs reveals sequential and non-redundant functions in mitotic cell cycle. *PLoS One* *10*, e0138794.
- Gibbs, E.B., Cook, E.C., and Showalter, S.A. (2017). Application of NMR to studies of intrinsically disordered proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* *628*, 57–70.
- Giese, K.P., and Mizuno, K. (2013). The roles of protein kinases in learning and memory. *Learn. Mem.* *20*, 540–552.
- Gill, J., Park, Y., McGinnis, J.P., Perez-Sanchez, C., Blanchette, M., and Si, K. (2017). Regulated intron removal integrates motivational state and experience. *Cell* *169*, 836-848.e15.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Giraldo, R. (2007). Defined DNA sequences promote the assembly of a bacterial protein into distinct amyloid nanostructures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 17388–17393.
- Giraldo, R. (2020). SynBio and the boundaries between functional and pathogenic RepA-Wh1 bacterial amyloids. *MSystems* *5*, e00553-20.
- Gisquet-Verrier, P., and Le Dorze, C. (2019). Post traumatic stress disorder and substance use disorder as two pathologies affecting memory reactivation: Implications for new therapeutic approaches. *Front. Behav. Neurosci.* *13*, 26.
- Goldschmidt, L., Teng, P.K., Riek, R., and Eisenberg, D. (2010). Identifying the amyloids, proteins capable of forming amyloid-like fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 3487–3492.
- Gomes, E., and Shorter, J. (2019). The molecular language of membraneless organelles. *J. Biol. Chem.* *294*, 7115–7127.
- Gómez Moreno, C., and Sancho, J. (2003). *Estructura de proteínas*. Ariel Ciencia, Barcelona (Ariel, Editorial S.A.).
- Gour, S., Kaushik, V., Kumar, V., Bhat, P., Yadav, S.C., and Yadav, J.K. (2016). Antimicrobial peptide (Cn-AMP2) from liquid endosperm of *Cocos nucifera* forms amyloid-like fibrillar structure. *J. Pept. Sci.* *22*, 201–207.
- Graether, S.P., Slupsky, C.M., and Sykes, B.D. (2003). Freezing of a fish antifreeze protein results in amyloid fibril formation. *Biophys. J.* *84*, 552–557.
- Gras, S.L., Waddington, L.J., and Goldie, K.N. (2011). Transmission electron microscopy of amyloid fibrils. *Methods Mol. Biol.* *752*, 197–214.
- Groisman, I., Ivshina, M., Marin, V., Kennedy, N.J., Davis, R.J., and Richter, J.D. (2006). Control of cellular senescence by CPEB. *Genes Dev.* *20*, 2701–2712.
- Gu, X., Schafer, N.P., Wang, Q., Song, S.S., Chen, M., Waxham, M.N., and Wolynes, P.G. (2020). Exploring the F-actin/CPEB3 interaction and its possible role in the molecular mechanism of long-term memory. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 202012964.
- Guillén-Boixet, J., Buzon, V., Salvatella, X., and Méndez, R. (2016). CPEB4 is regulated during cell cycle by ERK2/Cdk1-mediated phosphorylation and its assembly into liquid-like droplets. *Elife* *5*, e19298.
- Güntert, P., and Buchner, L. (2015). Combined automated NOE assignment and structure calculation with CYANA. *J. Biomol. NMR* *62*, 453–471.
- Guo, A., Gu, H., Zhou, J., Mulhern, D., Wang, Y., Lee, K.A., Yang, V., Aguiar, M., Kornhauser, J., Jia, X., et al. (2014). Immunoaffinity enrichment and mass spectrometry analysis of protein methylation. *Mol. Cell. Proteomics* *13*, 372–387.
- Guo, L., Kim, H.J., Wang, H., Monaghan, J., Freyermuth, F., Sung, J.C., O'Donovan, K., Fare, C.M., Diaz, Z., Singh, N., et al. (2018). Nuclear-import receptors reverse aberrant phase transitions of RNA-binding proteins with prion-like domains. *Cell* *173*, 677-692.e20.
- Guo, Y.E., Manteiga, J.C., Henninger, J.E., Sabari, B.R., Dall'Agnes, A., Hannett, N.M., Spille, J.H., Afeyan, L.K., Zamudio, A. V., Shrinivas, K., et al. (2019). Pol II phosphorylation regulates a switch between transcriptional and splicing condensates. *Nature* *572*, 543–548.
- Guyonnet, B., Egge, N., and Cornwall, G.A. (2014). Functional amyloids in the mouse sperm acrosome. *Mol. Cell. Biol.* *34*, 2624–2634.
- Hake, L.E., and Richter, J.D. (1994). CPEB is a specificity factor that mediates cytoplasmic polyadenylation during *Xenopus* oocyte maturation. *Cell* *79*, 617–627.

- Hamley, I.W., Kirkham, S., Dehsorkhi, A., Castelletto, V., Adamcik, J., Mezzenga, R., Ruokolainen, J., Mazzuca, C., Gatto, E., Venanzi, M., et al. (2014). Self-assembly of a model peptide incorporating a hexa-histidine sequence attached to an Oligo-Alanine sequence, and binding to gold NTA/nickel nanoparticles. *Biomacromolecules* 15, 3412–3420.
- Han, T.W.W., Kato, M., Xie, S., Wu, L.C.C., Mirzaei, H., Pei, J., Chen, M., Xie, Y., Allen, J., Xiao, G., et al. (2012). Cell-free formation of RNA granules: low complexity sequence domains form dynamic fibers within hydrogels. *Cell* 149, 768–779.
- Harrison, P.M. (2019). Evolutionary behaviour of bacterial prion-like proteins. *PLoS One* 14, e0213030.
- Harrison, A.F., and Shorter, J. (2017). RNA-binding proteins with prion-like domains in health and disease. *Biochem. J.* 474, 1417–1438.
- He, B., Wang, K., Liu, Y., Xue, B., Uversky, V.N., and Dunker, A.K. (2009). Predicting intrinsic disorder in proteins: An overview. *Cell Res.* 19, 929–949.
- Heinrich, B.S., Maliga, Z., Stein, D.A., Hyman, A.A., and Whelan, S.P.J. (2018). Phase transitions drive the formation of vesicular stomatitis virus replication compartments. *MBio* 9, e02290-17.
- Herczenik, E., Bouma, B., Korporaal, S.J.A., Strangi, R., Zeng, Q., Gros, P., Van Eck, M., Van Berkel, T.J.C., Gebbink, M.F.B.G., and Akkerman, J.W.N. (2007). Activation of human platelets by misfolded proteins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 1657–1665.
- Hervás, R., Oroz, J., Galera-Prat, A., Goñi, O., Valbuena, A., Vera, A.M., Gómez-Sicilia, À., Losada-Urzáiz, F., Uversky, V.N., Menéndez, M., et al. (2012). Common features at the start of the neurodegeneration cascade. *PLoS Biol.* 10, e1001335.
- Hervás, R., Li, L., Majumdar, A., Fernández-Ramírez, M. del C., Unruh, J.R., Slaughter, B.D., Galera-Prat, A., Santana, E., Suzuki, M., Nagai, Y., et al. (2016). Molecular basis of Orb2 amyloidogenesis and blockade of memory consolidation. *PLoS Biol.* 14, e1002361.
- Hervás, R., J. Rau, M., Park, Y., Zhang, W., G. Murzin, A., A.J. Fitzpatrick, J., Scheres, H.W., and Si, K. (2020a). Cryo-EM structure of a neuronal functional amyloid implicated in memory persistence in *Drosophila*. *Science* 367, 1230–1234.
- Hervás, R., Fernández-Ramírez, M. del C., Galera-Prat, A., Suzuki, M., Nagai, Y., Bruix, M., Menéndez, M., Laurents, D. V., and Carrión-Vázquez, M. (2020b). Divergent CPEB prion-like domains reveal different assembly mechanisms for a generic amyloid-like fold. *BioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2020.05.19.103804>.
- Hewetson, A., Do, H.Q., Myers, C., Muthusubramanian, A., Sutton, R.B., Wylie, B.J., and Cornwall, G.A. (2017). Functional amyloids in reproduction. *Biomolecules* 7, 46.
- Hofweber, M., and Dormann, D. (2019). Friend or foe-Post-translational modifications as regulators of phase separation and RNP granule dynamics. *J. Biol. Chem.* 294, 7137–7150.
- Hong, J.Y., Wang, D.D., Xue, W., Yue, H.W., Yang, H., Jiang, L.L., Wang, W.N., and Hu, H.Y. (2019). Structural and dynamic studies reveal that the Ala-rich region of ataxin-7 initiates  $\alpha$ -helix formation of the polyQ tract but suppresses its aggregation. *Sci. Rep.* 9, 1–12.
- Hopf, F.W. (2017). Do specific NMDA receptor subunits act as gateways for addictive behaviors? *Genes, Brain Behav.* 16, 118–138.
- Huang, W.H., Chao, H.W., Tsai, L.Y., Chung, M.H., and Huang, Y.S. (2014). Elevated activation of CaMKII $\alpha$  in the CPEB3-knockout hippocampus impairs a specific form of NMDAR-dependent synaptic depotentiation. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 367.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Huang, Y.S., Kan, M.C., Lin, C.L., and Richter, J.D. (2006). CPEB3 and CPEB4 in neurons: Analysis of RNA-binding specificity and translational control of AMPA receptor GluR2 mRNA. *EMBO J.* 25, 4865–4876.
- Hughes, M.P., Sawaya, M.R., Boyer, D.R., Goldschmidt, L., Rodriguez, J.A., Cascio, D., Chong, L., Gonen, T., and Eisenberg, D.S. (2018). Atomic structures of low-complexity protein segments reveal kinked  $\beta$  sheets that assemble networks. *Science* 359, 698–701.
- Hurshman, A.R., White, J.T., Powers, E.T., and Kelly, J.W. (2004). Transthyretin aggregation under partially denaturing conditions is a downhill polymerization. *Biochemistry* 43, 7365–7381.
- Hyman, S.E. (2005). Addiction: A disease of learning and memory. *Am. J. Psychiatry* 162, 1414–1422.
- Hyman, A.A., and Brangwynne, C.P. (2011). Beyond stereospecificity: Liquids and mesoscale organization of cytoplasm. *Dev. Cell* 21, 14–16.
- Iadanza, M.G., Jackson, M.P., Hewitt, E.W., Ranson, N.A., and Radford, S.E. (2018). A new era for understanding amyloid structures and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 755–773.
- Iakoucheva, L.M., Brown, C.J., Lawson, J.D., Obradović, Z., and Dunker, A.K. (2002). Intrinsic disorder in cell-signaling and cancer-associated proteins. *J. Mol. Biol.* 323, 573–584.
- Iconomidou, V.A., Vriend, G., and Hamodrakas, S.J. (2000). Amyloids protect the silkworm oocyte and embryo. *FEBS Lett.* 479, 141–145.
- Ivshina, M., Lasko, P., and Richter, J.D. (2014). Cytoplasmic polyadenylation element binding proteins in development, health, and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30, 393–415.
- Jabłoński, A. (1933). Efficiency of anti-stokes fluorescence in dyes [6]. *Nature* 131, 839–840.
- Jackson, M.P., and Hewitt, E.W. (2017). Why are functional amyloids non-toxic in humans? *Biomolecules* 7, 71.
- Jakob, U., Kriwacki, R., and Uversky, V.N. (2014). Conditionally and transiently disordered proteins: Awakening cryptic disorder to regulate protein function. *Chem. Rev.* 114, 6779–6805.
- Jayaraman, M., Kodali, R., Sahoo, B., Thakur, A.K., Mayasundari, A., Mishra, R., Peterson, C.B., and Wetzel, R. (2012). Slow amyloid nucleation via  $\alpha$ -helix-rich oligomeric intermediates in short polyglutamine-containing huntingtin fragments. *J. Mol. Biol.* 415, 881–899.
- Joag, H., Ghatpande, V., Desai, M., Sarkar, M., Raina, A., Shinde, M., Chitale, R., Deo, A., Bose, T., and Majumdar, A. (2019). A role of cellular translation regulation associated with toxic Huntingtin protein. *Cell. Mol. Life Sci.* 77, 3657–3670.
- Jorda, J., and Kajava, A. V. (2010). Protein homorepeats: Sequences, structures, evolution, and functions. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology Vol.79*, (Academic Press Inc.), pp. 59–88.
- Kaczmarczyk, L., Labrie-Dion, É., Sehgal, K., Sylvester, M., Skubal, M., Josten, M., Steinhäuser, C., De Koninck, P., and Theis, M. (2016). New phosphospecific antibody reveals isoform-specific phosphorylation of CPEB3 protein. *PLoS One* 11, e0150000.
- Kagan, B.L., Jang, H., Capone, R., Teran Arce, F., Ramachandran, S., Lal, R., and Nussinov, R. (2012). Antimicrobial properties of amyloid peptides. *Mol. Pharm.* 9, 708–717.

- Kandel, E.R. (2007). In search of memory: The emergence of a new science of mind (Norton & Comapny).
- Kandel, E.R. (2012). The molecular biology of memory: CAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB. *Mol. Brain* 5, 14.
- Kandel, E.R., Dudai, Y., and Mayford, M.R. (2014). The molecular and systems biology of memory. *Cell* 157, 163–186.
- Karplus, M. (1963). Vicinal proton coupling in nuclear magnetic resonance. *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2870–2871.
- Kaur, G., Kapoor, S., and Thakur, K.G. (2018a). *Bacillus subtilis* HeID, an RNA polymerase interacting helicase, forms amyloid-like fibrils. *Front. Microbiol.* 9, 1934.
- Kaur, G., Kaundal, S., Kapoor, S., Grimes, J.M., Huisken, J.T., and Thakur, K.G. (2018b). *Mycobacterium tuberculosis* CarD, an essential global transcriptional regulator forms amyloid-like fibrils. *Sci. Rep.* 8, 10124.
- Kayed, R., Pensalfini, A., Margol, L., Sokolov, Y., Sarsoza, F., Head, E., Hall, J., and Glabe, C. (2009). Annular protofibrils area structurally and functionally distinct type of amyloid oligomer. *J. Biol. Chem.* 284, 4230–4237.
- Kelly, M.A., Chellgren, B.W., Rucker, A.L., Troutman, J.M., Fried, M.G., Miller, A.F., and Creamer, T.P. (2001). Host-Guest study of left-handed polyproline II helix formation. *Biochemistry* 40, 14376–14383.
- Kelly, S.M., Jess, T.J., and Price, N.C. (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1751, 119–139.
- Kendrew, J.C. (1958). Architecture of a protein molecule. *Nature* 182, 764–767.
- Kenney, J.M., Knight, D., Wise, M.J., and Vollrath, F. (2002). Amyloidogenic nature of spider silk. *Eur. J. Biochem.* 269, 4159–4163.
- Khan, M.R., Li, L., Pérez-Sánchez, C., Saraf, A., Florens, L., Slaughter, B.D., Unruh, J.R., and Si, K. (2015). Amyloidogenic oligomerization transforms *Drosophila* Orb2 from a translation repressor to an activator. *Cell* 163, 1468–1483.
- Kim, W., and Hecht, M.H. (2006). Generic hydrophobic residues are sufficient to promote aggregation of the Alzheimer's Aβ42 peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 15824–15829.
- Kim, H.J., Kim, N.C., Wang, Y.D., Scarborough, E.A., Moore, J., Diaz, Z., MacLea, K.S., Freibaum, B., Li, S., Molliex, A., et al. (2013). Mutations in prion-like domains in hnRNPA2B1 and hnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS. *Nature* 495, 467–473.
- Kirmizoglou, I., and Promponas, V.J. (2015). LCR-eXXXplorer: A WEB platform to search, visualize and share data for low complexity regions in protein sequences. *Bioinformatics* 31, 2208–2210.
- Kjaergaard, M., and Poulsen, F.M. (2011). Sequence correction of random coil chemical shifts: Correlation between neighbor correction factors and changes in the Ramachandran distribution. *J. Biomol. NMR* 50, 157–165.
- Kjaergaard, M., Brander, S., and Poulsen, F.M. (2011). Random coil chemical shift for intrinsically disordered proteins: Effects of temperature and pH. *J. Biomol. NMR* 49, 139–149.
- Kleino, A., Ramia, N.F., Bozkurt, G., Shen, Y., Nailwal, H., Huang, J., Napetschnig, J., Gangloff, M., Chan, F.K.M., Wu, H., et al. (2017). Peptidoglycan-sensing receptors trigger

## VII. BIBLIOGRAFÍA

the formation of functional amyloids of the adaptor protein Imd to initiate *Drosophila* NF- $\kappa$ B signaling. *Immunity* *47*, 635-647.e6.

Knowles, T.P.J., Vendruscolo, M., and Dobson, C.M. (2014). The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 384–396.

Kotler, S.A., Walsh, P., Brender, J.R., and Ramamoorthy, A. (2014). Differences between amyloid- $\beta$  aggregation in solution and on the membrane: Insights into elucidation of the mechanistic details of Alzheimer's disease. *Chem. Soc. Rev.* *43*, 6692–6700.

Kraus, A. (2016). Proline and lysine residues provide modulatory switches in amyloid formation: Insights from prion protein. *Prion* *10*, 57–62.

Krishnan, R., Goodman, J.L., Mukhopadhyay, S., Pacheco, C.D., Lemke, E.A., Deniz, A.A., and Lindquist, S. (2012). Conserved features of intermediates in amyloid assembly determine their benign or toxic states. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 11172–11177.

Kumar, A., Ernst, R.R., and Wüthrich, K. (1980). A two-dimensional nuclear Overhauser enhancement (2D NOE) experiment for the elucidation of complete proton-proton cross-relaxation networks in biological macromolecules. *Top. Catal.* *95*, 1–6.

Kumari, B., Kumar, R., and Kumar, M. (2015). Low complexity and disordered regions of proteins have different structural and amino acid preferences. *Mol. Biosyst.* *11*, 585–594.

De La Osa, J.L., Bateman, D.A., Ho, S., González, C., Chakrabarty, A., and Laurents, D. V. (2007). Getting specificity from simplicity in putative proteins from the prebiotic Earth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 14941–14946.

Lackie, R.E., Maciejewski, A., Ostapchenko, V.G., Marques-Lopes, J., Choy, W.Y., Duennwald, M.L., Prado, V.F., and Prado, M.A.M. (2017). The Hsp70/Hsp90 chaperone machinery in neurodegenerative diseases. *Front. Neurosci.* *11*, 254.

Ladouceur, A.-M., Parmar, B.S., Biedzinski, S., Wall, J., Tope, S.G., Cohn, D., Kim, A., Soubry, N., Reyes-Lamothe, R., and Weber, S.C. (2020). Clusters of bacterial RNA polymerase are biomolecular condensates that assemble through liquid–liquid phase separation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *117*, 18540–18549.

Lakowicz, J.R. (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy* (Springer, Boston, MA).

Lancaster, A.K., Nutter-Upham, A., Lindquist, S., and King, O.D. (2014). PLAAC: a web and command-line application to identify proteins with prion-like amino acid composition. *Bioinformatics* *30*, 2501–2502.

Lane, D.P., Brown, C., Madhumalar, A., Ghadessy, F.J., and Verma, C. (2010). Mdm2 and p53 are highly conserved from placozoans to man. *Cell Cycle* *9*, 540–547.

Lasagna-Reeves, C.A., Castillo-Carranza, D.L., Sengupta, U., Clos, A.L., Jackson, G.R., and Kaye, R. (2011). Tau oligomers impair memory and induce synaptic and mitochondrial dysfunction in wild-type mice. *Mol. Neurodegener.* *6*, 39.

Laurents, D., and Mompean, M. (2017). Intrinsically disordered domains, amyloids and protein liquid phases: Evolving concepts and open questions. *Protein Pept. Lett.* *24*, 281–293.

Lavoie, H., Debeane, F., Trinh, Q.D., Turcotte, J.F., Corbeil-Girard, L.P., Dicaire, M.J., Saint-Denis, A., Pagé, M., Rouleau, G.A., and Brais, B. (2003). Polymorphism, shared functions and convergent evolution of genes with sequences coding for polyalanine domains. *Hum. Mol. Genet.* *12*, 2967–2979.

Lazcano, A. (2016). Alexandr I. Oparin and the origin of life: A historical reassessment of the heterotrophic theory. *J. Mol. Evol.* *83*, 214–222.



- Lee, J., Culyba, E.K., Powers, E.T., and Kelly, J.W. (2011). Amyloid- $\beta$  forms fibrils by nucleated conformational conversion of oligomers. *Nat. Chem. Biol.* 7, 602–609.
- Lee, W., Tonelli, M., and Markley, J.L. (2015). NMRFAM-SPARKY: enhanced software for biomolecular NMR spectroscopy. *Bioinformatics* 31, 1325–1327.
- Li, H.R., Chiang, W.C., Chou, P.C., Wang, W.J., and Huang, J. (2018). TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) liquid-liquid phase separation is mediated by just a few aromatic residues. *J. Biol. Chem.* 293, 6090–6098.
- Li, L., Sanchez, C.P., Slaughter, B.D., Zhao, Y., Khan, M.R., Unruh, J.R., Rubinstein, B., and Si, K. (2016). A putative biochemical engram of long-term memory. *Curr. Biol.* 26, 3143–3156.
- Li, M., Liu, J., Ran, X., Fang, M., Shi, J., Qin, H., Goh, J.M., and Song, J. (2006). Resurrecting abandoned proteins with pure water: CD and NMR studies of protein fragments solubilized in salt-free water. *Biophys. J.* 91, 4201–4209.
- Li, P., Banjade, S., Cheng, H.C., Kim, S., Chen, B., Guo, L., Llaguno, M., Hollingsworth, J. V., King, D.S., Banani, S.F., et al. (2012). Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins. *Nature* 483, 336–340.
- Li, Y.R., King, O.D., Shorter, J., and Gitler, A.D. (2013). Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis. *J. Cell Biol.* 201, 361–372.
- Liebman, S.W., and Chernoff, Y.O. (2012). Prions in yeast. *Genetics* 191, 1041–1072.
- Lim, L., Wei, Y., Lu, Y., and Song, J. (2016). ALS-causing mutations significantly perturb the self-assembly and interaction with nucleic acid of the intrinsically disordered prion-like domain of TDP-43. *PLOS Biol.* 14, e1002338.
- Liu, B.A., Jablonowski, K., Shah, E.E., Engelmann, B.W., Jones, R.B., and Nash, P.D. (2010). SH2 domains recognize contextual peptide sequence information to determine selectivity. *Mol. Cell. Proteomics* 9, 2391–2404.
- López-Alonso, J.P., Bruix, M., Font, J., Ribó, M., Vilanova, M., Jiménez, M.A., Santoro, J., González, C., and Laurents, D. V. (2010). NMR spectroscopy reveals that RNase A is chiefly denatured in 40% acetic acid: Implications for oligomer formation by 3D domain swapping. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 1621–1630.
- Lorenzen, N., Nielsen, S.B., Buell, A.K., Kaspersen, J.D., Arosio, P., Vad, B.S., Paslawski, W., Christiansen, G., Valnickova-Hansen, Z., Andreasen, M., et al. (2014). The role of stable  $\alpha$ -synuclein oligomers in the molecular events underlying amyloid formation. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 3859–3868.
- Lovell, S.C., Davis, I.W., Arendall, W.B., De Bakker, P.I.W., Word, J.M., Prisant, M.G., Richardson, J.S., and Richardson, D.C. (2003). Structure validation by C $\alpha$  geometry:  $\phi$ ,  $\psi$  and C $\beta$  deviation. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 50, 437–450.
- Lu, J., Cao, Q., Hughes, M.P., Sawaya, M.R., Boyer, D.R., Cascio, D., and Eisenberg, D.S. (2020). CryoEM structure of the low-complexity domain of hnRNPA2 and its conversion to pathogenic amyloid. *Nat. Commun.* 11, 1–11.
- Lu, W.-H., Yeh, N.-H., and Huang Correspondence, Y.-S. (2017). CPEB2 activates GRASP1 mRNA translation and promotes AMPA receptor surface expression, long-term potentiation, and memory. *Cell Rep.* 21, 1783–1794.
- Lupas, A., Van Dyke, M., and Stock, J. (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* 252, 1162–1164.
- MacDonald, M.E., Ambrose, C.M., Duyao, M.P., Myers, R.H., Lin, C., Srinidhi, L., Barnes,

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- G., Taylor, S.A., James, M., Groot, N., et al. (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72, 971–983.
- Maharana, S., Wang, J., Papadopoulos, D.K., Richter, D., Pozniakovsky, A., Poser, I., Bickle, M., Rizk, S., Guillén-Boixet, J., Franzmann, T.M., et al. (2018). RNA buffers the phase separation behavior of prion-like RNA binding proteins. *Science* 360, 918–921.
- Maji, S.K., Perrin, M.H., Sawaya, M.R., Jessberger, S., Vadodaria, K., Rissman, R.A., Singru, P.S., Nilsson, K.P.R., Simon, R., Schubert, D., et al. (2009a). Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules. *Science* 325, 328–332.
- Maji, S.K., Wang, L., Greenwald, J., and Riek, R. (2009b). Structure-activity relationship of amyloid fibrils. *FEBS Lett.* 583, 2610–2617.
- Majumdar, A., Cesario, W.C., White-Grindley, E., Jiang, H., Ren, F., Khan, M.R., Li, L., Choi, E.M.-L., Kannan, K., Guo, F., et al. (2012). Critical role of amyloid-like oligomers of *Drosophila* Orb2 in the persistence of memory. *Cell* 148, 515–529.
- Mäntylähti, S., Hellman, M., and Permi, P. (2011). Extension of the HA-detection based approach: (HCA)CON(CA)H and (HCA)NCO(CA)H experiments for the main-chain assignment of intrinsically disordered proteins. *J. Biomol. NMR* 49, 99–109.
- March, Z.M., King, O.D., and Shorter, J. (2016). Prion-like domains as epigenetic regulators, scaffolds for subcellular organization, and drivers of neurodegenerative disease. *Brain Res.* 1647, 9–18.
- Markley, J.L., Bax, A., Arata, Y., Hilbers, C.W., Kaptein, R., Sykes, B.D., Wright, P.E., and Wüthrich, K. (1998). Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids. *J. Mol. Biol.* 280, 933–952.
- Marley, J., Lu, M., and Bracken, C. (2001). A method for efficient isotopic labeling of recombinant proteins. *J. Biomol. NMR* 20, 71–75.
- Martin, E.W., and Mittag, T. (2018). Relationship of sequence and phase separation in protein low-complexity regions. *Biochemistry* 57, 2478–2487.
- Mcswiggen, D.T., Mir, M., Darzacq, X., and Tjian, R. (2019). Evaluating phase separation in live cells: diagnosis, caveats, and functional consequences. *Genes Dev.* 33, 1619–1634.
- Mendez, R., and Richter, J.D. (2001). Translational control by CPEB: A means to the end. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 521–529.
- Metzler, W.J., Bell, A.J., Ernst, E., Lavoie, T.B., and Mueller, L. (1994). Identification of the poly-L-proline-binding site on human profilin. *J. Biol. Chem.* 269, 4620–4625.
- Mier, P., and Andrade-Navarro, M.A. (2020). The features of polyglutamine regions depend on their evolutionary stability. *BMC Evol. Biol.* 20, 1–12.
- Mier, P., Paladin, L., Tamana, S., Petrosian, S., Hajdu-Soltész, B., Urbanek, A., Gruca, A., Plewczynski, D., Grynberg, M., Bernadó, P., et al. (2019). Disentangling the complexity of low complexity proteins. *Brief. Bioinform.* 21, 458–472.
- Milovanovic, D., Wu, Y., Bian, X., and De Camilli, P. (2018). A liquid phase of synapsin and lipid vesicles. *Science* 361, 604–607.
- Mitchell, S.F., Jain, S., She, M., and Parker, R. (2013). Global analysis of yeast mRNPs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 127–133.
- Mitrea, D.M., and Kriwacki, R.W. (2016). Phase separation in biology; functional organization of a higher order. *Cell Commun. Signal.* 14, 1.

- Mizielinska, S., Grönke, S., Niccoli, T., Ridler, C.E., Clayton, E.L., Devoy, A., Moens, T., Norona, F.E., Woollacott, I.O.C., Pietrzyk, J., et al. (2014). C9orf72 repeat expansions cause neurodegeneration in *Drosophila* through arginine-rich proteins. *Science* 345, 1192–1194.
- Molliex, A., Temirov, J., Lee, J., Coughlin, M., Kanagaraj, A.P., Kim, H.J., Mittag, T., Taylor, J.P., and Deshpande, J.P.T.A.M. (2015). Phase separation by low complexity domains promotes stress granule assembly and drives pathological fibrillization. *163*, 123–133.
- Mompeán, M., Li, W., Li, J., Laage, S., Siemer, A.B., Bozkurt, G., Wu, H., and McDermott, A.E. (2018). The structure of the necrosome RIPK1-RIPK3 core, a human hetero-amyloid signaling complex. *Cell* 173, 1244-1253.e10.
- Mompeán, M., Ramírez de Mingo, D., and Hervás, R. (2019). Molecular mechanism of the inhibition of TDP-43 amyloidogenesis by QBP1. *Arch. Biochem. Biophys.* 675, 108113.
- Monahan, Z., Ryan, V.H., Janke, A.M., Burke, K.A., Rhoads, S.N., Zerze, G.H., O’Meally, R., Dignon, G.L., Conicella, A.E., Zheng, W., et al. (2017). Phosphorylation of the FUS low-complexity domain disrupts phase separation, aggregation, and toxicity. *EMBO J.* 36, 2951–2967.
- Moreno-Gonzalez, I., Edwards, G., Salvadores, N., Shahnawaz, M., Diaz-Espinoza, R., and Soto, C. (2017). Molecular interaction between type 2 diabetes and Alzheimer’s disease through cross-seeding of protein misfolding. *Mol. Psychiatry* 22, 1327–1334.
- Moriarty, D.F., and Raleigh, D.P. (1999). Effects of sequential proline substitutions on amyloid formation by human amylin<sub>20-29</sub>. *Biochemistry* 38, 1811–1818.
- Morón-Oset, J., Supèr, T., Esser, J., Isaacs, A.M., Grönke, S., and Partridge, L. (2019). Glycine-Alanine dipeptide repeats spread rapidly in a repeat length- and age-dependent manner in the fly brain. *Acta Neuropathol. Commun.* 7, 209.
- Mostaert, A.S., Giordani, C., Crockett, R., Karsten, U., Schumann, R., and Jarvis, S.P. (2009). Characterisation of amyloid nanostructures in the natural adhesive of unicellular subaerial algae. *J. Adhes.* 85, 465–483.
- Muiznieks, L.D., Sharpe, S., Pomès, R., and Keeley, F.W. (2018). Role of liquid–liquid phase separation in assembly of elastin and other extracellular matrix proteins. *J. Mol. Biol.* 430, 4741–4753.
- Mukrasch, M.D., Bibow, S., Korukottu, J., Jeganathan, S., Biernat, J., Griesinger, C., Mandelkow, E., and Zweckstetter, M. (2009). Structural polymorphism of 441-residue Tau at single residue resolution. *PLoS Biol.* 7, e1000034.
- Muñoz, V., Serrano, L., Jiménez, M.A., and Rico, M. (1995). Structural analysis of peptides encompassing all  $\alpha$ -helices of three  $\alpha/\beta$  parallel proteins: Che-Y, flavodoxin and P21-Ras: Implications for  $\alpha$ -Helix stability and the folding of  $\alpha/\beta$  parallel proteins. *J. Mol. Biol.* 247, 648–669.
- Murthy, A.C., and Fawzi, N.L. (2020). The (un)structural biology of biomolecular liquid-liquid phase separation using NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 295, 2375–2384.
- Muscolino, E., Schmitz, R., Lorocho, S., Caragliano, E., Schneider, C., Rizzato, M., Kim, Y.H., Krause, E., Juranić Lisnić, V., Sickmann, A., et al. (2020). Herpesviruses induce aggregation and selective autophagy of host signalling proteins NEMO and RIPK1 as an immune-evasion mechanism. *Nat. Microbiol.* 5, 331–342.
- Nagai, Y., Inui, T., Popiel, H.A., Fujikake, N., Hasegawa, K., Urade, Y., Goto, Y., Naiki, H., and Toda, T. (2007). A toxic monomeric conformer of the polyglutamine protein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 332–340.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Neumann, M., Sampathu, D.M., Kwong, L.K., Truax, A.C., Micsenyi, M.C., Chou, T.T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C.M., et al. (2006). Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314, 130–133.
- Nicoll, R.A. (2017). A brief history of long-term potentiation. *Neuron* 93, 281–290.
- Novoa, I., Gallego, J., Ferreira, P.G., and Mendez, R. (2010). Mitotic cell-cycle progression is regulated by CPEB1 and CPEB4-dependent translational control. *Nat. Cell Biol.* 12, 447–456.
- Oakley, M.G., and Kim, P.S. (1998). A buried polar interaction can direct the relative orientation of helices in a coiled coil. *Biochemistry* 37, 12603–12610.
- Oh, J., Kim, J.G., Jeon, E., Yoo, C.H., Jae, S.M., Rhee, S., and Hwang, I. (2007). Amyloidogenesis of type III-dependent harpins from plant pathogenic bacteria. *J. Biol. Chem.* 282, 13601–13609.
- Oldfield, C.J., Uversky, V.N., Dunker, A.K., and Kurgan, L. (2019). Introduction to intrinsically disordered proteins and regions. In *Intrinsically Disordered Proteins*, (Elsevier), pp. 1–34.
- Oroz, J., Félix, S.S., Cabrita, E.J., and Laurents, D. V. (2020). Structural transitions in Orb2 prion-like domain relevant for functional aggregation in memory consolidation. *BioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2020.07.08.193656>.
- Otzen, D., and Riek, R. (2019). Functional amyloids. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 11, a033860.
- Pantoja-Uceda, D., and Santoro, J. (2013). Direct correlation of consecutive C'-N groups in proteins: A method for the assignment of intrinsically disordered proteins. *J. Biomol. NMR* 57, 57–63.
- Pantoja-Uceda, D., and Santoro, J. (2014). New <sup>13</sup>C-detected experiments for the assignment of intrinsically disordered proteins. *J. Biomol. NMR* 59, 43–50.
- Parras, A., Anta, H., Santos-Galindo, M., Swarup, V., Elorza, A., Nieto-González, J.L., Picó, S., Hernández, I.H., Díaz-Hernández, J.I., Belloc, E., et al. (2018). Autism-like phenotype and risk gene mRNA deadenylation by CPEB4 mis-splicing. *Nature* 560, 441–446.
- Patel, A., Lee, H.O., Jawerth, L., Drechsel, D., Hyman, A.A., Alberti, S., Maharana, S., Janel, M., Hein, M.Y., Stoyanov, S., et al. (2015). A liquid-to-solid phase transition of the ALS protein FUS accelerated by disease mutation. *Cell* 162, 1066–1077.
- Pavlopoulos, E., Trifilieff, P., Chevaleyre, V., Fioriti, L., Zairis, S., Pagano, A., Malleret, G., and Kandel, E.R. (2011). Neuralized1 activates CPEB3: a function for nonproteolytic ubiquitin in synaptic plasticity and memory storage. *Cell* 147, 1369–1383.
- Pechmann, S., and Frydman, J. (2014). Interplay between chaperones and protein disorder promotes the evolution of protein networks. *PLoS Comput. Biol.* 10, e1003674.
- Pederson, T. (2011). The nucleolus. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, 1–15.
- Pelassa, I., Corà, D., Cesano, F., Monje, F.J., Montarolo, P.G., and Fiumara, F. (2014). Association of polyalanine and polyglutamine coiled coils mediates expansion disease-related protein aggregation and dysfunction. *Hum. Mol. Genet.* 23, 3402–3420.
- Peng, S.C., Lai, Y.T., Huang, H.Y., Huang, H. Da, and Huang, Y.S. (2010). A novel role of CPEB3 in regulating EGFR gene transcription via association with Stat5b in neurons. *Nucleic Acids Res.* 38, 7446–7457.
- Pentelute, B.L., Gates, Z.P., Tereshko, V., Dashnau, J.L., Vanderkooi, J.M., Kossiakoff, A.A., and Kent, S.B.H. (2008). X-ray structure of snow flea antifreeze protein determined by

racemic crystallization of synthetic protein enantiomers. *J. Am. Chem. Soc.* *130*, 9695–9701.

Pham, C.L., Shanmugam, N., Strange, M., O'Carroll, A., Brown, J.W., Sierrecki, E., Gambin, Y., Steain, M., and Sunde, M. (2019). Viral M45 and necroptosis-associated proteins form heteromeric amyloid assemblies. *EMBO Rep.* *20*, e46518.

Pires, R.H., Karsai, Á., Saraiva, M.J., Damas, A.M., and Kellermayer, M.S.Z. (2012). Distinct annular oligomers captured along the assembly and disassembly pathways of transthyretin amyloid protofibrils. *PLoS One* *7*, e44992.

Polling, S., Ormsby, A.R., Wood, R.J., Lee, K., Shoubridge, C., Hughes, J.N., Thomas, P.Q., Griffin, M.D.W., Hill, A.F., Bowden, Q., et al. (2015). Polyalanine expansions drive a shift into  $\alpha$ -helical clusters without amyloid-fibril formation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *22*, 1008–1015.

Pontius, B.W., and Berg, P. (1990). Renaturation of complementary DNA strands mediated by purified mammalian heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 protein: Implications for a mechanism for rapid molecular assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 8403–8407.

Prilusky, J., Felder, C.E., Zeev-Ben-Mordehai, T., Rydberg, E.H., Man, O., Beckmann, J.S., Silman, I., and Sussman, J.L. (2005). FoldIndex: a simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded. *Bioinformatics* *21*, 3435–3438.

Prochazkova, B., Komrskova, P., and Kubelka, M. (2018). CPEB2 is necessary for proper porcine meiotic maturation and embryonic development. *Int. J. Mol. Sci.* *19*, 3138.

Prusiner, S.B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* *216*, 136–144.

Pujols, J., Santos, J., Pallarès, I., and Ventura, S. (2018). The disordered C-terminus of yeast hsf1 contains a cryptic low-complexity amyloidogenic region. *Int. J. Mol. Sci.* *19*, 1384.

Qamar, S., Wang, G.Z., Randle, S.J., Ruggeri, F.S., Varela, J.A., Lin, J.Q., Phillips, E.C., Miyashita, A., Williams, D., Ströhl, F., et al. (2018). FUS phase separation is modulated by a molecular chaperone and methylation of arginine cation- $\pi$  interactions. *Cell* *173*, 720–734.e15.

Qu, W.R., Sun, Q.H., Liu, Q.Q., Jin, H.J., Cui, R.J., Yang, W., Song, D.B., and Li, B.J. (2020). Role of CPEB3 protein in learning and memory: New insights from synaptic plasticity. *Aging (Albany, NY)*. *12*, 15169–15182.

Ramaswami, M., Taylor, J.P., and Parker, R. (2013). Altered ribostasis: RNA-protein granules in degenerative disorders. *Cell* *154*, 727–736.

Rauscher, S., Baud, S., Miao, M., Keeley, F.W.W., and Pomès, R. (2006). Proline and glycine control protein self-organization into elastomeric or amyloid fibrils. *Structure* *14*, 1667–1676.

Raveendra, B.L., Siemer, A.B., Puthanveetil, S. V., Hendrickson, W.A., Kandel, E.R., and McDermott, A.E. (2013). Characterization of prion-like conformational changes of the neuronal isoform of Aplysia CPEB. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 495–501.

Ren, B., Zhang, Y., Zhang, M., Liu, Y., Zhang, D., Gong, X., Feng, Z., Tang, J., Chang, Y., and Zheng, J. (2019). Fundamentals of cross-seeding of amyloid proteins: An introduction. *J. Mater. Chem. B* *7*, 7267–7282.

Ren, R., Mayer, B.J., Cicchetti, P., and Baltimore, D. (1993). Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* *259*, 1157–1161.

Riback, J.A., Katanski, C.D., Kear-Scott, J.L., Pilipenko, E. V, Rojek, A.E., Sosnick, T.R., and Drummond, D.A. (2017). Stress-triggered phase separation is an adaptive, evolutionarily tuned response. *Cell* *168*, 1028–1040.e19.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Richter, J.D. (2007). CPEB: a life in translation. *Trends Biochem. Sci.* 32, 279–285.
- Riek, R., and Saupe, S.J. (2016). The HET-s/s prion motif in the control of programmed cell death. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8, 1–11.
- Roan, N.R., Sandi-Monroy, N., Kohgadai, N., Usmani, S.M., Hamil, K.G., Neidleman, J., Montano, M., Ständker, L., Röcker, A., Cavrois, M., et al. (2017). Semen amyloids participate in spermatozoa selection and clearance. *Elife* 6, e24888.
- Romanova, N. V, and Chernoff, Y.O. (2009). Hsp104 and prion propagation. *Protein Pept. Lett.* 16, 598–605.
- Rosen, C.G., and Weber, G. (1969). Dimer formation from 1-anilino-8-naphthalenesulfonate catalyzed by bovine serum albumin. A new fluorescent molecule with exceptional binding properties. *Biochemistry* 8, 3915–3920.
- Ross, C.A., and Poirier, M.A. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat. Med.* 10, S10.
- Ross, E.D., Edskes, H.K., Terry, M.J., and Wickner, R.B. (2005). Primary sequence independence for prion formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 12825–12830.
- Ruff, K.M., Roberts, S., Chilkoti, A., and Pappu, R. V. (2018). Advances in understanding stimulus-responsive phase behavior of intrinsically disordered protein polymers. *J. Mol. Biol.* 430, 4619–4635.
- Saad, S., Cereghetti, G., Feng, Y., Picotti, P., Peter, M., and Dechant, R. (2017). Reversible protein aggregation is a protective mechanism to ensure cell cycle restart after stress. *Nat. Cell Biol.* 19, 1202–1213.
- Salehi-Ashtiani, K., Lupták, A., Litovchick, A., and Szostak, J.W. (2006). A genomewide search for ribozymes reveals an HDV-like sequence in the human CPEB3 gene. *Science* 313, 1788–1792.
- Santoro, J. (2018). *Espectroscopía de RMN de alta resolución* (Publishing Bubok S.L.).
- Santos, J., Iglesias, V., Santos-Suárez, J., Mangiagalli, M., Brocca, S., Pallarès, I., and Ventura, S. (2020). pH-dependent aggregation in intrinsically disordered proteins is determined by charge and lipophilicity. *Cells* 9, 145.
- Serio, T.R., Cashikar, A.G., Kowal, A.S., Sawicki, G.J., Moslehi, J.J., Serpell, L., Arnsdorf, M.F., and Lindquist, S.L. (2000). Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant. *Science* 289, 1317–1321.
- Shen, Y., Delaglio, F., Cornilescu, G., and Bax, A. (2009). TALOS+: A hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts. *J. Biomol. NMR* 44, 213–223.
- Shorter, J. (2017). Liquidizing FUS via prion-like domain phosphorylation. *EMBO J.* 36, 2925–2927.
- Si, K., and Kandel, E.R. (2016). The role of functional prion-like proteins in the persistence of memory. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8, a021774.
- Si, K., Lindquist, S., and Kandel, E.R. (2003). A neuronal isoform of the aplysia CPEB has prion-like properties. *Cell* 115, 879–891.
- Si, K., Choi, Y.B., White-Grindley, E., Majumdar, A., and Kandel, E.R. (2010). Aplysia CPEB can form prion-like multimers in sensory neurons that contribute to long-term facilitation. *Cell* 140, 421–435.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H.,

- Remmert, M., Söding, J., et al. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7, 7:539.
- Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569–572.
- Sipe, J.D., and Cohen, A.S. (2000). Review: History of the amyloid fibril. *J. Struct. Biol.* 130, 88–98.
- Soragni, A., Yousefi, S., Stoeckle, C., Soriaga, A.B., Sawaya, M.R., Kozlowski, E., Schmid, I., Radonjic-Hoesli, S., Boutet, S., Williams, G.J., et al. (2015). Toxicity of eosinophil MBP is repressed by intracellular crystallization and promoted by extracellular aggregation. *Mol. Cell* 57, 1011–1021.
- Soria, M.A., Cervantes, S.A., Bajakian, T.H., and Siemer, A.B. (2017). The functional amyloid Orb2A binds to lipid membranes. *Biophys. J.* 113, 37–47.
- Spannl, S., Tereshchenko, M., Mastromarco, G.J., Ihn, S.J., and Lee, H.O. (2019). Biomolecular condensates in neurodegeneration and cancer. *Traffic* 20, 890–911.
- Stephan, J.S., Fioriti, L., Lamba, N., Colnaghi, L., Karl, K., Derkatch, I.L., and Kandel, E.R. (2015). The CPEB3 protein is a functional prion that interacts with the actin cytoskeleton. *Cell Rep.* 11, 1772–1785.
- Sun, Y., Kakinen, A., Xing, Y., Pilkington, E.H., Davis, T.P., Ke, P.C., and Ding, F. (2019). Nucleation of  $\beta$ -rich oligomers and  $\beta$ -barrels in the early aggregation of human islet amyloid polypeptide. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1865, 434–444.
- Sun, Z.Y.J., Frueh, D.P., Selenko, P., Hoch, J.C., and Wagner, G. (2005). Fast assignment of  $^{15}\text{N}$ -HSQC peaks using high-resolution 3D HNCOCA<sup>2</sup>NH experiments with non-uniform sampling. *J. Biomol. NMR* 33, 43–50.
- Suzuki, G., and Tanaka, M. (2013). Expanding the yeast prion world: Active prion conversion of non-glutamine/asparagine-rich Mod5 for cell survival. *Prion* 7, 109–113.
- Tayeb-Fligelman, E., Tabachnikov, O., Moshe, A., Goldshmidt-Tran, O., Sawaya, M.R., Coquelle, N., Colletier, J.P., and Landau, M. (2017). The cytotoxic *Staphylococcus aureus* PSM $\alpha$ 3 reveals a cross- $\alpha$  amyloid-like fibril. *Science* 355, 831–833.
- Terlau, H., and Seifert, W. (1990). Fibroblast growth factor enhances long-term potentiation in the hippocampal slice. *Eur. J. Neurosci.* 2, 973–977.
- Terry, R.D., Masliah, E., Salmon, D.P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L.A., and Katzman, R. (1991). Physical basis of cognitive alterations in alzheimer's disease: Synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann. Neurol.* 30, 572–580.
- Tetz, G., and Tetz, V. (2018). Prion-like domains in eukaryotic viruses. *Sci. Rep.* 8, 8931.
- Thakur, A.K., Yang, W., and Wetzel, R. (2004). Inhibition of polyglutamine aggregate cytotoxicity by a structure-based elongation inhibitor. *FASEB J.* 18, 923–925.
- Theis, M., Si, K., and Kandel, E.R. (2003). Two previously undescribed members of the mouse CPEB family of genes and their inducible expression in the principal cell layers of the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 9602–9607.
- Thompson, M.J., Sievers, S.A., Karanicolas, J., Ivanova, M.I., Baker, D., and Eisenberg, D. (2006). The 3D profile method for identifying fibril-forming segments of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 4074–4078.
- Tipping, K.W., Van Oosten-Hawle, P., Hewitt, E.W., and Radford, S.E. (2015). Amyloid fibres: inert end-stage aggregates or key players in disease? *Trends Biochem. Sci.* 40, 719–727.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

Tommaso, P. Di, Moretti, S., Xenarios, I., Orobítg, M., Montanyola, A., Chang, J.-M., Taly, J.-F.O., and Notredame, C. (2011). T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *39*, W13-7.

Torrent, M., Valle, J., Nogués, M.V., Boix, E., and Andreu, D. (2011). The generation of antimicrobial peptide activity: A trade-off between charge and aggregation? *Angew. Chemie Int. Ed.* *50*, 10686–10689.

Treviño, M.Á., Pantoja-Uceda, D., Menéndez, M., Gomez, M.V., Mompeán, M., and Laurents, D. V. (2018). The singular NMR fingerprint of a polyproline II helical bundle. *J. Am. Chem. Soc.* *140*, 16988–17000.

Tsai, L.Y., Chang, Y.W., Lin, P.Y., Chou, H.J., Liu, T.J., Lee, P.T., Huang, W.H., Tsou, Y.L., and Huang, Y.S. (2013). CPEB4 knockout mice exhibit normal hippocampus-related synaptic plasticity and memory. *PLoS One* *8*, 84978.

Tsolis, A.C., Papandreou, N.C., Iconomidou, V.A., and Hamodrakas, S.J. (2013). A consensus method for the prediction of “aggregation-prone” peptides in globular proteins. *PLoS One* *8*, e54175.

Tsuda, K., Kuwasako, K., Nagata, T., Takahashi, M., Kigawa, T., Kobayashi, N., Güntert, P., Shirouzu, M., Yokoyama, S., and Muto, Y. (2014). Novel RNA recognition motif domain in the cytoplasmic polyadenylation element binding protein 3. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* *82*, 2879–2886.

Tsvetkov, P., Eisen, T.J., Heinrich, S.U., Brune, Z., Hallacli, E., Newby, G.A., Kayatekin, C., Pincus, D., and Lindquist, S. (2020). Persistent activation of mRNA translation by transient Hsp90 inhibition. *Cell Rep.* *32*, 108001.

Turoverov, K.K., Kuznetsova, I.M., Uversky, V.N., Biophys, P., and Biol, M. (2010). The protein kingdom extended: ordered and intrinsically disordered proteins, their folding, supramolecular complex formation, and aggregation. *Prog Biophys Mol Biol* *102*, 73–84.

Turoverov, K.K., Kuznetsova, I.M., Fonin, A. V., Darling, A.L., Zaslavsky, B.Y., and Uversky, V.N. (2019). Stochasticity of biological soft matter: Emerging concepts in intrinsically disordered proteins and biological phase separation. *Trends Biochem. Sci.* *44*, 716–728.

Uversky, V.N. (2003). Protein folding revisited. A polypeptide chain at the folding - Misfolding - Nonfolding cross-roads: Which way to go? *Cell. Mol. Life Sci.* *60*, 1852–1871.

Uversky, V.N. (2013). Unusual biophysics of intrinsically disordered proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* *1834*, 932–951.

Uversky, V.N. (2015). The multifaceted roles of intrinsic disorder in protein complexes. *FEBS Lett.* *589*, 2498–2506.

Uversky, V.N. (2016). Dancing protein clouds: the strange biology and chaotic physics of intrinsically disordered proteins. *J. Biol. Chem.* *291*, 6681–6688.

Uversky, V.N. (2019). Intrinsically disordered proteins and their “Mysterious” (meta)physics. *Front. Phys.* *7*, 10.

Vacic, V., Oldfield, C.J., Mohan, A., Radivojac, P., Cortese, M.S., Uversky, V.N., and Dunker, A.K. (2007). Characterization of molecular recognition features, MoRFs, and their binding partners. *J. Proteome Res.* *6*, 2351–2366.

Villar-Piqué, A., Sabaté, R., Lopera, O., Gibert, J., Torne, J.M., Santos, M., and Ventura, S. (2010). Amyloid-like protein inclusions in tobacco transgenic plants. *PLoS One* *5*, e13625.

Vogler, C., Spalek, K., Aerni, A., Demougin, P., Müller, A., Huynh, K.D., Papassotiropoulos,



- A., and de Quervain, D.J.F. (2009). CPEB3 is associated with human episodic memory. *Front. Behav. Neurosci.* 3, 4.
- Vuister, G.W., and Bax, A. (1993). Quantitative J correlation: A new approach for measuring homonuclear three-bond J(HN/H $\alpha$ ) coupling constants in <sup>15</sup>N-enriched proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 115, 7772–7777.
- Wagner, R. (1835). Einige Bemerkungen und Fragen über das Keimbläschen (vesicular germinativa). *Müller's Arch. Anat Physiol Wiss. Med* 373–377.
- Wang, X.P., and Cooper, N.G.F. (2009). Characterization of the transcripts and protein isoforms for cytoplasmic polyadenylation element binding protein-3 (CPEB3) in the mouse retina. *BMC Mol. Biol.* 10, 109.
- Wang, A., Conicella, A.E., Schmidt, H.B., Martin, E.W., Rhoads, S.N., Reeb, A.N., Nourse, A., Ramirez Montero, D., Ryan, V.H., Rohatgi, R., et al. (2018a). A single N-terminal phosphomimic disrupts TDP-43 polymerization, phase separation, and RNA splicing. *EMBO J.* 37, e97452.
- Wang, J., Choi, J.M., Holehouse, A.S., Lee, H.O., Zhang, X., Jahnel, M., Maharana, S., Lemaître, R., Pozniakovskiy, A., Drechsel, D., et al. (2018b). A molecular grammar governing the driving forces for phase separation of prion-like RNA binding proteins. *Cell* 174, 688-699.e16.
- Wang, Z., Zhang, G., and Zhang, H. (2019). Protocol for analyzing protein liquid–liquid phase separation. *Biophys. Reports* 5, 1–9.
- Ward, J.J., Sodhi, J.S., McGuffin, L.J., Buxton, B.F., and Jones, D.T. (2004). Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life. *J. Mol. Biol.* 337, 635–645.
- Weitzhandler, I., Dzuricky, M., Hoffmann, I., Garcia Quiroz, F., Gradzielski, M., and Chilkoti, A. (2017). Micellar self-assembly of recombinant resilin-/elastin-like block copolypeptides. *Biomacromolecules* 18, 2419–2426.
- White-Grindley, E., Li, L., Mohammad Khan, R., Ren, F., Saraf, A., Florens, L., and Si, K. (2014). Contribution of Orb2A stability in regulated amyloid-like oligomerization of *Drosophila* Orb2. *PLoS Biol.* 12, e1001786.
- Wickner, R.B. (1994). [URE3] as an altered URE2 protein: Evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 264, 566–569.
- Wilczynska, A., Aigueperse, C., Kress, M., Dautry, F., and Weil, D. (2005). The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules. *J. Cell Sci.* 118, 981–992.
- Williams, D.B., and Carter, C.B. (2009). *Transmission electron microscopy: A textbook for materials science* (Springer Science & Business Media).
- Williams, T.L., and Serpell, L.C. (2011). Membrane and surface interactions of Alzheimer's A $\beta$  peptide - Insights into the mechanism of cytotoxicity. *FEBS J.* 278, 3905–3917.
- Wilson, E.B. (1899). The structure of protoplasm. *Science* 10, 33–45.
- Woodruff, J.B., Hyman, A.A., and Boke, E. (2018). Organization and function of non-dynamic biomolecular condensates. *Trends Biochem. Sci.* 43, 81–94.
- Wösten, H.A.B. (2001). Hydrophobins: Multipurpose proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 625–646.
- Wright, P.E., and Dyson, H.J. (2009). Linking folding and binding. *Curr. Opin. Struct. Biol.*

## VII. BIBLIOGRAFÍA

19, 31–38.

Xu, D., Farmer, A., Collett, G., Grishin, N. V., and Chook, Y.M. (2012). Sequence and structural analyses of nuclear export signals in the NESdb database. *Mol. Biol. Cell* 23, 3677–3693.

Xue, B., Dunbrack, R.L., Williams, R.W., Dunker, A.K., and Uversky, V.N. (2010). PONDR-FIT: A meta-predictor of intrinsically disordered amino acids. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1804, 996–1010.

Xue, B., Romero, P.R., Noutsou, M., Maurice, M.M., Rüdiger, S.G.D., William, A.M., Mizianty, M.J., Kurgan, L., Uversky, V.N., and Dunker, A.K. (2013). Stochastic machines as a colocalization mechanism for scaffold protein function. *FEBS Lett.* 587, 1587–1591.

Yuan, A.H., and Hochschild, A. (2017). A bacterial global regulator forms a prion. *Science* 355, 198–201.

Zeng, G., Vad, B.S., Dueholm, M.S., Christiansen, G., Nilsson, M., Tolker-Nielsen, T., Nielsen, P.H., Meyer, R.L., and Otzen, D.E. (2015). Functional bacterial amyloid increases *Pseudomonas* biofilm hydrophobicity and stiffness. *Front. Microbiol.* 6, 1099.

Zeng, M., Shang, Y., Araki, Y., Guo, T., Huganir, R.L., and Zhang, M. (2016). Phase transition in postsynaptic densities underlies formation of synaptic complexes and synaptic plasticity. *Cell* 166, 1163-1175.e12.

Zhang, S., Liu, H., Chuang, C.L., Li, X., Au, M., Zhang, L., Phillips, A.R.J., Scott, D.W., and Cooper, G.J.S. (2014). The pathogenic mechanism of diabetes varies with the degree of overexpression and oligomerization of human amylin in the pancreatic islet  $\beta$  cells. *FASEB J.* 28, 5083–5096.

**Parte VIII**  
**ANEXO**

## VIII. ANEXO

### 8.1. Material suplementario

Tabla 8.1: Secuencia de la región intrínsecamente desordenada de hCPEB3.

	1	10	20	30	40	50	
S1	MQDDLIMDKS	KTQPQPQQQ	RQQQQPQPES	SVSEAPSTPL	SSETPKPEEN		
	SAVPALSPAA	APPAPNGPDK	MQMESPLLPG	LSFHQPPQQP	PPPQEPAAPG		
	110	120	130	140	150		S2
S3	ASLSPSFGST	WSTGTTNAVE	DSFFQGITPV	NGTMLFQNEP	HHVNPVFGGT		
	FSPQIGLAQT	QHHQQPPPPA	PAPQPAQPAQ	PPQAQPPQOR	RSPASPSQAP		
	210	220	230	240	250		S4
S5	YAQRSAAAAY	GHQPIMTSKP	SSSSAVAAAA	AAAAASSASS	SWNTHQSVNA		
	AWSAPSNPWG	GLQAGRDP RR	AVGVGVGVGV	GVP SPLNPI S	PLKKPF SSNV		
	310	320	330	340	350		S6
S7	IAPPKFP RAA	PLTSKSWMED	NAFRTDNGNN	LLPFQDRSRP	YDTENLHS LE		
	NSLMDMIRTD	HEPLKGRMGI	NFHHPGTDNI	MALNSRSSLF	PFEDAFLDD S		
	410	420	430	440	450		S8
	HGDQAL SSG L	SSPTRCQNGE	RVERYSRKVF	VGGLPPDIDE	DEITASFRRE		

Segmento 1 (S1): residuos 1-100;

Segmento 2 (S2): residuos 51-150;

Segmento 3 (S3): residuos 101-200;

Segmento 4 (S4): residuos 152-250;

Segmento 5 (S5): residuos 202-300;

Segmento 6 (S6): residuos 251-350;

Segmento 7 (S7): residuos 302-350;

Segmento 8 (S8): residuos 352-450.

- Los residuos de interés estructural y funcional aparecen indicados en **negrita**.

- Sitio putativo de dimetilación en el residuo de arginina **R308**.

- Sitio putativo de fosforilación en el residuo de tirosina **Y341** de la secuencia consenso reconocible por el dominio SH2 de STAT5B.

- Señal de exportación nuclear **L349-L353**.

- Sitios putativos de fosforilación de los residuos de serina **S284**, **S290**, **S297**, **S298**, **S400**, **S407**, **S408**, **S411** y **S412**.

- Los residuos pertenecientes al primer dominio *RRM1* aparecen en *cursiva*.

Tabla 8.2: Secuencia de cebadores y condiciones de PCR de los segmentos de hCPEB3.

SEGMENTO	Secuencia del cebador directo	Secuencia del cebador reverso	Condiciones de PCR		
			DEN	ALI	EXT
<b>CPEB3 S1</b> 1-100aa	CTAGCTAGCGAAAACCTGTATTTTCA GATCAGGATGATTTACTGATGG	CACCTCGAGTCATCAGCCCG GTGCCGCGGGCTCC	98 °C	10''	30 ciclos
			59 °C	30''	
			72 °C	15''	
<b>CPEB3 S2</b> 51-150aa	CTAGCTAGCGAAAACCTGTATTTTCA GAGCGCAGTGCCCGCCCTCAGCC	CACCTCGAGTCATCAAGTGC CTCCGAAAGACTGGG	98 °C	10''	30 ciclos
			60 °C	30''	
			72 °C	15''	
<b>CPEB3 S3</b> 101-200aa	CTAGCTAGCGAAAACCTGTATTTTCA GGCCTGGAGCGCACCGTCCAACC	CACCTCGAGTCATCAGGGCG CCTGGCTGGGGCTGGC	98 °C	10''	30 ciclos
			60 °C	30''	
			72 °C	15''	
<b>CPEB3 S4</b> 152-250aa	CTAGCTAGCGAAAACCTGTATTTTCA GTCCTTAATGGATATGATAAGG	CACCTCGAGTCATCATGCAT TCACGCTTTGGTGC	98 °C	10''	30 ciclos
			60 °C	30''	
			72 °C	15''	
<b>CPEB3 S5</b> 202-300aa	CTAGCTAGCGAAAACCTGTATTTTCA GTCCTTAATGGATATGATAAGG	CACCTCGAGTCATCACACGT TGCTGGAGAAAGGGC	98 °C	10''	30 ciclos
			60 °C	30''	
			72 °C	15''	
<b>CPEB3 S6</b> 251-350aa	CTAGCTAGCGAAAACCTGTATTTTCA GTCCTTAATGGATATGATAAGG	CACCTCGAGTCATCACTCCA ACGAGTGAAGTTAAAAG	98 °C	10''	30 ciclos
			60 °C	30''	
			72 °C	15''	
<b>CPEB3 S7</b> 302-400aa	CTAGCTAGCGAAAACCTGTATTTTCA GGCGCCGCCCAAGTCCCTCCG	CACCTCGAGTCATCAGCTAT CATCCAGGAAGGC	98 °C	10''	30 ciclos
			63 °C	30''	
			72 °C	15''	
<b>CPEB3 S8</b> 352-450aa	CTAGCTAGCGAAAACCTGTATTTTCA GTCCTTAATGGATATGATAAGG	CACCTCGAGTCATCAAAACC TGCGAAAGCTGGC	98 °C	10''	30 ciclos
			60 °C	30''	
			72 °C	15''	

**Tabla 8.3: Secuencia de cebadores y condiciones de PCR de las regiones de hCPEB3.**

REGIÓN	Secuencia del cebador directo	Secuencia del cebador reverso	Condiciones de PCR		
			DEN	98 °C	10''
<b>CPEB3 IDR 1-426aa</b>	CTAGCTAGCGAAAACCTGTATTTTCA GATGCAGGATGATTTACTGATGG	CACCTCGAGTCATCAAACC TGCGAAAGCTGGC	DEN	98 °C	10''
			ANN	63 °C	30''
			EXT	72 °C	1'
<b>CPEB3 R1-3 1-200aa</b>	CTAGCTAGCGAAAACCTGTATTTTCA GAGCGCAGTCCGGCCCTCAGCC	CACCTCGAGTCATCAGGGCG CCTGGCTGGGGCTGGC	DEN	98 °C	10''
			ANN	62 °C	30''
			EXT	72 °C	1'
<b>CPEB3 R1-5 1-300aa</b>	CTAGCTAGCGAAAACCTGTATTTTCA GGCCTGGAGCGCACCCGTCCAACC	CACCTCGAGTCATCACAGT TGCTGGAGAAGGGC	DEN	98 °C	10''
			ANN	62 °C	30''
			EXT	72 °C	1'
<b>CPEB3 R5-8 202-450aa</b>	CTAGCTAGCGAAAACCTGTATTTTCA GTCCTTAATGGATATGATAAGG	CACCTCGAGTCATCAGCTAT CATCCAGGAAGGC	DEN	98 °C	10''
			ANN	60 °C	30''
			EXT	72 °C	45''
<b>CPEB3 R7-8 302-450aa</b>	CTAGCTAGCGAAAACCTGTATTTTCA GGCGCCGCCCAAGTCCCTCGC	CACCTCGAGTCATCAGCTAT CATCCAGGAAGGC	DEN	98 °C	10''
			ANN	60 °C	30''
			EXT	72 °C	45''

\* DEN: temperatura de desnaturalización.

§ ALL: temperatura de alineamiento.

† EXT: temperatura de extensión.

## VIII. ANEXO

Tabla 8.4: Parámetros espectrales de RMN.

Experimento	Número de barridos	Anchura espectral (ppm)	Matriz
<i>Segmentos 1, 3, 4, 5, 6, 7 &amp; 8</i>			
1D $^1\text{H}$	8	10	32k
2D $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC	2-8	$10\ ^1\text{H} \times 20\ ^{15}\text{N}$	2k x 512
2D CON*	4-16	$10\ ^{13}\text{CO} \times 35\ ^{15}\text{N}$	1k x 512
3D HNCO	4-8	$10\ ^1\text{H} \times 20\ ^{15}\text{N} \times 10\ ^{13}\text{C}$	2k x 64 x 128
3D hacacoNcaNCO*	8	$10\ ^{13}\text{CO} \times 35\ ^{15}\text{N} \times 20\ ^{15}\text{N}$	1k x 48 x 96
3D hacaCONcaNCO*	8	$10\ ^{13}\text{CO} \times 35\ ^{15}\text{N} \times 20\ ^{13}\text{CO}$	1k x 48 x 96
3D CCCON*		$10\ ^{13}\text{CO} \times 35\ ^{15}\text{N} \times 60$	1k x 56 x 96
3D CBCACON	8	$10\ ^{13}\text{CO} \times 35\ ^{15}\text{N} \times 60$ $^{13}\text{C}(\text{aliphatic})$	1k x 64 x 80
3D HNHA <sup>§</sup>	8	$11\ ^1\text{HN} \times 23\ ^{15}\text{N} \times 11\ ^1\text{H}\alpha$	2k x 96 x 48
<i>Segmentos 3, 7 &amp; 8<sup>†</sup></i>			
3D HNcaCO	16	$10\ ^1\text{H} \times 20\ ^{15}\text{N} \times 10\ ^{13}\text{C}$	2k x 32 x 64
3D hNcocaNH	12	$10\ ^1\text{H} \times 20\ ^{15}\text{N} \times 20\ ^{15}\text{N}$	2k x 64 x 90
3D HncocaNH	12	$10\ ^{13}\text{CO} \times 20\ ^{15}\text{N} \times 10\ ^{13}\text{CO}$	2k x 96 x 48
3D CBCAcoNH	16	$10\ ^1\text{H} \times 20\ ^{15}\text{N} \times 10\ ^{13}\text{C}$	2k x 32 x 64
<i>Relajación</i>			
2D $\{^1\text{H}\}$ - $^{15}\text{N}$ NOE <sup>¶</sup>	8-16	$10\ ^1\text{H} \times 20\ ^{15}\text{N}$	2k x 512
2D $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ T <sub>1</sub> $\rho$ <sup>‡</sup>	8-16	$10\ ^1\text{H} \times 20\ ^{15}\text{N}$	2k x 256
<i>Péptidos 1 &amp; 2</i>			
2D $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY	16	11 x 11	2k x 512
2D $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ TOCSY	8	11 x 11, $t_{\text{mezcla}} = 60\ \text{ms}$	2k x 512
2D $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ NOESY	64	11 x 11, $t_{\text{mezcla}} = 150\ \text{ms}$	2k x 512
2D $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC	144	10 x 80, registrados en 100% D <sub>2</sub> O	1k x 128
2D $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC	512	10 x 20	1k x 96

\* Detección de  $^{13}\text{C}$ ; procesado con desacoplamiento virtual IPAP en fase y anti-fase.

§ Registrado para algunos segmentos para medir las constantes de acoplamiento  $^1\text{HN}$ - $^1\text{H}\alpha$ .

† Registrado para los segmentos 3, 7 y 8, cuya baja concentración requería experimentos de detección  $^1\text{H}$ .

¶ Se usó un intervalo de 10 segundos entre pulsos. Los registros de forma intercalada.

‡ Se registraron diez espectros a intervalos de 8, 300, 36, 76, 900, 100, 500, 156, 200 y 16.

## 8.2. Índice de figuras y tablas

### Figuras

Figura 1.1: Diagrama de Ramachandran.....	5
Figura 1.2: Modelo del paisaje de energía libre de las IDPs .....	6
Figura 1.3: Frecuencia de aminoácidos en las IDPs y LCRs .....	8
Figura 1.4: Mecanismos de formación de amiloide.....	13
Figura 1.5: Hipótesis amiloide para la enfermedad de Alzheimer.....	15
Figura 1.6: Ejemplos de condensados biomoleculares en la célula eucariota.....	17
Figura 1.7: Tipos de diagramas de separación de fases.....	20
Figura 1.8: Estructura de la familia de proteínas CPEB y su función neuronal.....	26
Figura 1.9: Modelo del amiloide de Orb2B y su función en la consolidación de la memoria .....	29
Figura 1.10: Distribución celular de CPEB3 .....	31
Figura 1.10: Experimentos para la asignación de IDPs .....	38
Figura 3.1: Representación esquemática del procedimiento para el marcaje isotópico con $^{13}\text{C}$ y $^{15}\text{N}$ .....	54
Figura 3.2. Estrategia no convencional para la asignación de los espectros 2D CON .....	57
Figura 4.1: Alineamiento de secuencia de la proteína CPEB3 .....	70
Figura 4.2: Caracterización biofísica de la IDR de hCPEB3 .....	71
Figura 4.3: Espectro 2D $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC del segmento 4 .....	73
Figura 4.4: Espectro 2D $^{13}\text{CO}$ - $^{15}\text{N}$ del segmento 4.....	74
Figura 4.5: Espectros 2D $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC y $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC y desplazamientos químicos conformacionales de los residuos 91-110.....	75
Figura 4.6: Hélice $\alpha$ parcial del extremo N-terminal y hélice PPII de los residuos 84-94 .....	76
Figura 4.7: Espectro 2D $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ NOESY y desplazamientos químicos conformacionales de los residuos del extremo N-terminal .....	77
Figura 4.8: Desplazamientos químicos conformacionales de los residuos de prolina .....	79
Figura 4.9: Dinámica por residuo de la IDR de hCPEB3 .....	82
Figura 4.10: Hélices $\alpha$ parciales de los residuos 201-250 .....	83
Figura 4.11: Valores de las constantes de acoplamiento $^1\text{HN}$ - $^1\text{H}\alpha$ para el segmento 5.....	84
Figura 4.12: Estabilización de las hélices $\alpha$ en amiloides funcionales y patológicos .....	85
Figura 4.13: Hélice $\alpha$ parcial de la NES y fosforilación putativa del residuo Y341.....	86
Figura 4.14: Análisis bioinformático de la secuencia de hCPEB3.....	89
Figura 4.15: Predicciones de la tendencia del PLD de hCPEB3 a la formación de cremalleras estéricas de amiloide .....	90
Figura 4.16: Predicción de la tendencia de hCPEB3 a formar condensados biomoleculares.....	91
Figura 4.17: Cinéticas de formación de amiloide de la IDR y la FL de hCPEB3. ....	92
Figura 4.18: Características estructurales de las regiones y los segmentos amiloidogénicos de hCPEB3 .....	92
Figura 4.19: Cinéticas de formación de amiloide de las regiones y los segmentos de hCPEB3. ....	93



## VIII. ANEXO

Figura 4.20: Efecto inhibitor del péptido anti-amiloidogénico QBP1 .....	94
Figura 4.21: Identificación de las secuencias de hCPEB3 con tendencia a la LLPS mediante análisis por delección secuencial .....	95
Figura 4.22: Dinámica de los condensados líquidos que forman las secuencias de hCPEB3 .....	96
Figura 4.23: Cinéticas de formación de amiloide de las regiones R5-8 y R7-8 de hCPEB3. ....	97
Figura 4.24: Composición de aminoácidos de las regiones y segmentos de la IDR de hCPEB3. ....	98
Figura 4.25: Evolución temporal de la formación de condensados líquidos, hidrogel y amiloide de la IDR de hCPEB3.....	99
Figura 4.26: Características de los condensados líquidos que forma la IDR de hCPEB3 .....	100
Figura 4.27: Efecto de la fuerza iónica en la LLPS y la amiloidogénesis de la IDR de hCPEB3. ....	101
Figura 4.28: Caracterización estructural de la LLPS de la IDR de hCPEB3.....	102
Figura 4.29: Inhibición de la LLPS y la amiloidogénesis de la IDR de hCPEB3 en presencia del amiloide de A $\beta$ <sub>42</sub> . ....	102
Figura 4.30: Efecto de la chaperona Hsp70 sobre la condensación de hCPEB3 .....	103
Figura 4.31: Efecto de la chaperona Hsp70 sobre la formación de amiloide de la IDR de hCPEB3....	104
Figura 4.32: La IDR de hCPEB3 tiene características en común con los amiloides patológicos.....	105
Figura 4.33: Citotoxicidad mediada por las especies amiloides de la IDR de hCPEB3.....	106
Figura 4.33: Efecto de la Hsp70 sobre la citotoxicidad mediada por los oligómeros de la IDR de hCPEB3. ....	107
Figura 4.34: Viscosidad de los gránulos de hCPEB3 en células vivas SH-SY5Y.....	108
Figura 5.1: Representación esquemática de la estructura y composición de hCPEB3 .....	113
Figura 5.2: Modelo de los cambios estructurales del PLD de hCPEB3 durante la consolidación de la memoria.....	118
Figura 5.3: Bases estructurales de la consolidación de la memoria mediada por hCPEB3 .....	122

### Tablas

Tabla 1.1: Listado de amiloides funcionales con evidencia experimental.....	24
Tabla 5.1: Las hélices $\alpha$ hidrófobas y las zonas ricas en residuos de prolina modulan la formación de amiloide de los segmentos ricos en residuos de Q y Q/N. ....	115
Tabla 5.2: Desplazamientos químicos conformacionales de estructura secundaria en hélice $\alpha$ , hebra $\beta$ y hélices PPII.....	116
Tabla 8.1: Secuencia de la región intrínsecamente desordenada de hCPEB3.....	157
Tabla 8.2: Secuencia de cebadores y condiciones de PCR de los segmentos de hCPEB3. ....	158
Tabla 8.3: Secuencia de cebadores y condiciones de PCR de las regiones de hCPEB3. ....	159
Tabla 8.4: Parámetros espectrales de RMN.....	160

### 8.3. Publicaciones

1. María Eugenia Vaquero, Daniel Ramírez de Mingo, María del Carmen Fernández Ramírez, Douglas V. Laurents, Tamar Unger, Albert García Galera-Prat, Salvador Ventura, Edward A. Bayer, Mariano Carrión Vázquez (2020) **Remarkable properties of an atypical Q/N/W-rich linker from a bacterial xylanase** (en preparación)
2. Daniel Ramírez de Mingo, David Pantoja-Uceda, Rubén Hervás, Mariano Carrión-Vázquez, Douglas V. Laurents (2020) **Preferred conformations in the intrinsically disordered región of human CPEB3, a functional amyloid key for memory consolidation** Preprint BioRxiv (en revisión)
3. Daniel Ramírez de Mingo, Paula López-García, Rubén Hervás, Douglas V. Laurents, Mariano Carrión-Vázquez (2020) **Molecular determinants of liquid demixing and amyloidogenesis in human CPEB3** Preprint BioRxiv (en revisión)
4. Paula López-García, Daniel Ramírez de Mingo, Kerry R. McGreevy, Anna Pallé López, Helena Akiko Popiel, Andrea Santi, Yoshitaka Nagai, José Luis Trejo, Mariano Carrión-Vázquez (2020) **An anti-amyloidogenic treatment to specifically block the consolidation of traumatic events in mouse** Preprint BioRxiv (under review)
5. Miguel Mompeán, Daniel Ramírez de Mingo, Rubén Hervás, María del Carmen Fernández-Ramírez, Mariano Carrión-Vázquez, Douglas V. Laurents (2019) **Molecular mechanism of the inhibition of TDP-43 amyloidogenesis by QBP1** *Arch Biochem Biophys* 675 108-113

