

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Medicina
Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia

**NANOMECÁNICA DEL MONÓMERO DE TAU Y
DESARROLLO DE UNA NUEVA ESTRATEGIA PARA SU ESTUDIO**

Memoria presentada por **María del Carmen Fernández Ramírez** para optar al grado
de Doctora en Neurociencia

El presente trabajo de tesis doctoral ha sido desarrollado en el Departamento de
Neurobiología Molecular, Celular y del Desarrollo del Instituto Cajal (IC-CSIC), bajo
la dirección del **Dr. Mariano Sixto Carrión Vázquez**.

Madrid, 2019



Memoria presentada por **MARÍA DEL CARMEN FERNÁNDEZ RAMÍREZ**, licenciada en Biotecnología, para optar al grado de DOCTORA EN NEUROCIENCIA POR LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID.

MARIANO-SIXTO CARRIÓN VÁZQUEZ, Doctor en Biología y Científico Titular del CSIC,

AUTORIZA la presentación de la Tesis Doctoral titulada "**Nanomecánica del monómero de tau y desarrollo de una nueva estrategia para su estudio**", de la que es autora la Lcda. María del Carmen Fernández Ramírez y ha sido realizada bajo mi dirección en el Instituto Cajal del CSIC, Madrid.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Madrid, el día 28 de febrero de 2019.

Fdo.: Mariano Sixto Carrión Vázquez

Instituto Cajal, CSIC

Madrid

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que han contribuido a la realización de esta tesis. Sin ellas, este trabajo, periodo formativo y experiencia vital hubiese tenido otro color o, simplemente, no existiría.

En primer lugar, tengo que dar las gracias a mi director de tesis, Mariano Carrión Vázquez, por darme la oportunidad de ser parte de su laboratorio. Desde el primer momento me ha dado la posibilidad de participar en los proyectos que me parecían más interesantes, contribuyendo así a mi interés y ganas de seguir aprendiendo. Sus ideas, apoyo, confianza en mi trabajo y dirección han sido imprescindibles en esta etapa y en lo que espero que sea el inicio de mi carrera científica.

Mi agradecimiento también a los colaboradores y socios del consorcio *MisingLink*, beneficiario del Programa Europeo JPND (*Joint Programme in Neurodegenerative Diseases*) en el que se enmarca esta tesis y cuyos fondos ha utilizado. Especialmente, quiero agradecer al Dr. Douglas Laurents por su continua amabilidad, completa disponibilidad e inestimable ayuda en muchas de las técnicas estructurales que he utilizado. Además, quiero agradecer al Prof. Marek Cieplak su interés en nuestro sistema de estudio ya que recientemente ha iniciado estudios de simulación por dinámica molecular en el mismo, que confiamos corroboren nuestros resultados y añadan detalles importantes a nivel atómico. En cuando al servicio técnico de microscopía electrónica, resaltar el fabuloso trabajo de Martin Maher.

A mis compañeros de laboratorio del C-17 y B-21 Yanclod, Bort, Trabu, Rosauron, Grimalder, Isa-Mazorca, Laura-Living Las Vegas, Ànyal, RobertoCarro, Samanta, Daniel, Mariu, Paula, Sofia... y muchos otros que han pasado por aquí. Habéis hecho que aprenda muchas cosas y habéis llenado esta etapa con risas y buenos momentos que siempre recordaré con cariño.

A mis amigos, que cerca o lejos, siempre han estado ahí para solventar o hacer más llevadero cualquier contratiempo que pudiera surgir y celebrar todo lo bueno que me ha ido pasando. Y por supuesto, a mi familia, por acompañarme en esta etapa y haberme dado todas las oportunidades que han podido y me han permitido llegar hasta aquí. Gracias.

¡Abuelo, que ya he acabado!

Las taupatías pertenecen a un grupo de enfermedades neurodegenerativas caracterizadas por la agregación amiloide patológica de la proteína tau. Dado que está involucrada en un gran número de demencias, de las que la Enfermedad de Alzheimer es la más conocida, la comunidad científica ha invertido un gran esfuerzo en su estudio. Desde que fue aislada por primera vez en 1975, se han realizado grandes avances en la comprensión de su papel fisiológico y patológico, habiéndose propuesto diferentes aproximaciones terapéuticas para inhibir su agregación. Sin embargo, sus complejas características estructurales (similares a las de otras proteínas neurotóxicas) la hacen una proteína con la que es muy difícil de trabajar y que, por tanto, dificultan su estudio. Como consecuencia de esta situación, los mecanismos moleculares que desencadenan la agregación patológica de tau aún no han sido descubiertos, lo que se encuentra obviamente vinculado a la carencia de un tratamiento frente a su agregación amiloide.

La espectroscopía de fuerzas de molécula individual basada en la microscopía de fuerzas atómicas (AFM-SMFS) es una técnica monomolecular que, en combinación con la ingeniería de proteínas, ha permitido que el campo de la “nanomecánica de proteínas” responda a preguntas que hasta ahora no podían ser abordadas. El estudio nanomecánico de tau a nivel de su monómero analiza su comportamiento estructural antes de la agregación y permite discernir aquellos cambios conformacionales primarios subyacentes a dicha formación de amiloide, pudiendo establecer una diana molecular hacia la que dirigir la intervención farmacológica. En esta tesis, gracias al desarrollo del vector pFS-2, específico para el estudio nanomecánico del monómero de Proteínas Intrínsecamente Desordenadas (IDPs), como es el caso de tau, se ha conseguido un exhaustivo análisis comparativo de tau *wt* y los mutantes proagregantes $\Delta 280K$ y P301L, causantes de demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17, en diferentes medios de agregación. Nuestros resultados demuestran que la pérdida de polimorfismo conformacional está directamente relacionada con la agregación, y establecemos un modelo en el que la pérdida de contactos intramoleculares dejaría a los monómeros expandidos permitiendo la interacción entre ellos para formar el dímero de nucleación amiloide. Por otra parte, se consigue discernir el diferente papel de ambas mutaciones en la modulación del comportamiento del monómero.

Finalmente debemos destacar que el polimorfismo de tau, y en general las proteínas amiloides, genera registros muy heterogéneos y complejos cuyas señales, además, pueden aparecer entremezcladas con los marcadores de monomolecularidad

a lo largo del espectro. Esta situación generó muchas dificultades en el análisis, que lo hacen muy dependiente de experto, razón por la cual se ha desarrollado una nueva estrategia para hacer más eficiente y simplificar futuros estudios nanomecánicos de las IDPs en general y de los amiloides en particular. En base a la idea de la protección mecánica de la proteína bajo estudio que representa el fundamento del vector pFS-2, hemos implementado el uso de la cohesina c8C de la proteína modular escafoldina CipC como nuevo módulo portador, cuya estabilidad mecánica es superior a la de los módulos marcadores de monomolecularidad comúnmente utilizados. De esta forma, se consigue que la señal (picos de fuerza) de la proteína problema salga al final de los registros, lejos de la ruidosa zona proximal y tras el módulo portador que actúa como reportero. Esta estrategia permite eliminar la laboriosidad, esfuerzo y falibilidad para investigadores no-expertos en el campo asociada a la selección de registros válidos y a la asignación de picos de fuerza.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	3
1.1 Estructura de proteínas	3
1.1.1 Plegamiento	3
1.1.2 Proteínas Intrínsecamente Desordenadas	5
1.1.3 Malplegamiento.....	6
1.1.4 Modelos de formación de amiloide.....	8
1.1.5 Estructura de los oligómeros	10
1.1.6 Orgánulos sin membrana: separación macromolecular de fases en la célula	10
1.2 Proteína tau	13
2.1 Tau forma LLPS	15
2.1.1 Gránulos de estrés en el compartimento somatodentrítico	17
2.2 Taupatías y FTDP-17	17
1.1.7 Estudio de Proteínas Neurotóxicas por SMFS.....	21
OBJETIVOS.....	29
MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
Modelado por homología y simulaciones por dinámica molecular (DM).....	33
Clonaje molecular	34
Expresión y purificación de proteínas	36
Calorimetría diferencial de barrido	37
Dicroísmo circular (CD).....	37
Resonancia magnética nuclear (NMR)	38
Inmunodot blot	38
Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	38
Microinyección de proteínas en células individuales.	39
Turbidimetría y unión a Rojo Congo.....	39
AFM-SMFS	40

Análisis estadístico: test chi-cuadrado	42
RESULTADOS.....	47
BLOQUE I.....	47
COMPORTAMIENTO DEL MONOMERO DE TAU: SIMILITUDES Y DIFERENCIAS CON OTRAS PROTEÍNAS NEUROTÓXICAS.....	47
NANOMECÁNICA DE TAU	47
Validación de la estrategia	47
Nanomecánica de tau wt	56
EFECTO DEL PÉPTIDO ANTIAMILOIDOGÉNICO QBP1.....	59
EFECTO NANOMÉCANICO DE LAS MUTACIONES PROAGREGANTES Δ 280K y P301L.....	63
Validación de la estrategia	63
Nanomecánica de los mutantes	65
EN BUSCA DEL MECANISMO DE FORMACIÓN AMILOIDE DE TAU.....	67
Búsqueda de una variable adicional con dependencia en la agregación	67
Aparición de estructuras intramoleculares.....	68
Caracterización de las estructuras remanentes.....	70
Papel de las mutaciones en la formación de la primera barrera mecánica.....	71
Papel del medio en la formación de la primera barrera mecánica ...	73
CARACTERIZACIÓN DE LOS MUTANTES ASOCIADOS A FTDP-17	74
Aparición de estructuras intramoleculares en función del medio	76
Cambios en las estructuras en función de medios con distintas tendencias de agregación	79
BLOQUE II.....	85
La cohesina c8C como proteína portadora: caracterización teórica y experimental	85
Integridad de c8C cuando actúa como portador mecánico.....	90

Validación del uso de la cohesina c8C como portador mecánico	93
DISCUSIÓN.....	101
CONCLUSIONES.....	117
BIBLIOGRAFÍA.....	121
APÉNDICE.....	130
A. SECUENCIAS DE LOS VECTORES UTILIZADOS.....	131
B. SECUENCIAS DE LOS MÓDULOS c8C y c8C-MCS	133
C. PUBLICACIONES RELACIONADAS	135

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

- Figura 1-1. Modelos de paisaje energético de una proteína globular.
- Figura 1-2. Paisaje energético de una IDP.
- Figura 1-3. Mecanismos de agregación amiloide.
- Figura 1-4. Fases proteicas intracelulares y sus características.
- Figura 1-5. Representación esquemática del gen humano de tau, ARNm e isoformas proteicas.
- Figura 1-6. Representación esquemática de las repeticiones de tau en una LLPS.
- Figura 1-7. Estructura de los filamentos de tau.
- Figura 1-8. Análisis de la formación de oligómeros en tau.
- Figura 1-9. Desplegamiento mecánico de una proteína modular.
- Figura 1-10. Análisis nanomecánico de proteínas amiloides.
- Figura 4(I)-1. Efecto de la inserción de tau en la estabilidad termodinámica de la ubicuitina portadora.
- Figura 4(I)-2. Distribuciones de F_u generadas por ubicuitinas marcadoras de monomolecularidad y cuando actúan como portadoras.
- Figura 4(I)-3. Conformación global de las proteínas hospedadora, huésped y de fusión.
- Figura 4(I)-4. Espectros de RMN monodimensionales de Ubi-tau, tau y Ubi-MCS.
- Figura 4(I)-5. Estimación de la ganancia en estructura- β en los diferentes días de incubación tras la deconvolución de los espectros de CD.
- Figura 4(I)-6. Estudio de la fibrillogénesis de las proteínas tau mediante TEM.
- Figura 4(I)-7. Análisis de la conformación y toxicidad de la proteína de fusión Ubi-tau.
- Figura 4(I)-8. Análisis nanomecánico del monómero de tau.
- Figura 4(I)-9. Monitorización de la agregación amiloide en presencia de QBP1.
- Figura 4(I)-10. Fibrillogénesis de Ubi-tau en presencia y ausencia de QBP1 mediante TEM.
- Figura 4(I)-11. Análisis del polimorfismo conformacional del monómero tau en presencia de QBP1.
- Figura 4(I)-12. Mantenimiento de las estructuras hospedador y huésped y ausencia de interacciones espurias en las proteínas de fusión Ubi-tau mutantes.
- Figura 4(I)-13. Análisis nanomecánico de los mutantes de tau.
- Figura 4(I)-14. Cuantificación de las estructuras registradas.
- Figura 4(I)-15. Análisis de las estabilidades mecánicas de la primera barrera mecánica en las secuencias de tau y sus variantes.
- Figura 4(I)-16. Análisis de las longitudes desordenadas previas a la primera barrera mecánica.

- Figura 4(I)-17. Estabilidad de las estructuras formadas por tau *wt* en presencia de diferentes medios.
- Figura 4(I)-18. Caracterización y comparación de las poblaciones de ΔL_c generadas por la ruptura de la primera barrera mecánica de tau cuando se encuentra bajo el efecto de diferentes medios.
- Figura 4(I)-19. Frecuencia del número de estructuras en $\Delta 280K$ y P301L bajo el efecto de los distintos medios.
- Figura 4(I)-20. Análisis de las estabildades de la primera barrera mecánica en $\Delta 280K$.
- Figura 4(I)-21. Análisis de las longitudes hasta la primera barrera mecánica en $\Delta 280K$.
- Figura 4(I)-22. Descripción y comparación de los valores de F_u en P301L en función del tampón.
- Figura 4(I)-23. Caracterización y comparación de los ΔL_c previos a la primera estructura formada en P301L.
- Figura 4(II)-1. Alineamiento de secuencias de los ocho módulos de cohesina de CipC de *C. cellulolyticum*.
- Figura 4(II)-2. Caracterización mecánica de c8C.
- Figura 4(II)-3. RMSF de cada residuo aminoácido de los modelos estructurales de c8C y c8C-MCS durante DM libre.
- Figura 4(II)-4. Espectroscopía de CD de las construcciones de IDPs basadas en c8C.
- Figura 4(II)-5. Espectros de NMR de las construcciones basadas en c8C.
- Figura 4(II)-6. Datos de estabilidad térmica del c8C portador.
- Figura 4(II)-7. Análisis por SMFS de proteínas hospedador-huésped basadas en c8C.
- Figura 4(II)-8. Registros SMFS de tau con la estrategia c8C y marcadores moleculares de ubiquitina.
- Figura 4(II)-9. Comparación de los registros obtenidos por SMFS al analizar MBD con el vector pFS-2 y la estrategia del portador c8C.
- Figura 5-1. Modelo tipo *conversión conformacional nucleada* de la cascada amiloidogénica de tau.
- Tabla 1. Cebadores utilizados para el clonaje de las proteínas huésped, inserción de mutaciones puntuales y generación del MCS en el módulo c8C de la escafoldina de *C. cellulolyticum*.
- Tabla 2. Tabla de contingencia sobre la dependencia de QBP1 en la población mecanoestable de tau.
- Tablas 3 y 4. Análisis de la dependencia del medio y mutaciones en la población estructurada del monómero de tau.

Tablas 5 y 6. Análisis de dependendencia χ^2 de los distintos medios asociados a la agregación sobre la población M/NM de los mutantes $\Delta 280K$ y P301L.

ACRÓNIMOS

A β :	β -amiloide (<u>A</u> myloid- <u>β</u>).
AFM:	microscopio de fuerza atómica o microscopía de fuerzas atómicas (<u>A</u> tom <u>F</u> orce <u>M</u> icroscope/ <u>M</u> icroscopy).
aIDP:	proteína intrínsecamente desordenada amiloidogénica (<u>a</u> myloidogenic <u>I</u> ntr <u>I</u> n <u>s</u> ecally <u>D</u> isordered <u>P</u> rotein).
CD:	dicroísmo circular (<u>C</u> ircular <u>D</u> ichroism)
CR:	rojo congo (<u>C</u> ongo <u>R</u> ed).
ΔL_c :	incremento en longitud de contorno (<u>C</u> ontour <u>L</u> ength <u>I</u> ncrease)
DSS:	2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato sódico (<u>2,2-D</u> imethyl- <u>2-S</u> ilapentane- <u>5-S</u> ulfonate sodium salt).
EEM:	<u>E</u> rror <u>E</u> stándar de la <u>M</u> edia.
EA:	<u>E</u> nfermedad de <u>A</u> lzheimer.
FTDP-17:	demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (<u>F</u> rontotemporal <u>D</u> ementia with <u>P</u> arkinsonism linked to <u>C</u> hromosome 17).
F_u :	fuerza de desplegamiento (<u>u</u> n <u>f</u> olding <u>F</u> orce).
GBSA:	área de superficie generalizada de Born (<u>G</u> eneralized <u>B</u> orn <u>S</u> urface <u>A</u> rea)
hM:	hipermecanoestable (<u>h</u> yper- <u>M</u> echanostable)
IDP:	proteína intrínsecamente desordenada (<u>I</u> ntr <u>I</u> n <u>s</u> ecally <u>D</u> isordered <u>P</u> rotein).
LCD:	dominios de baja complejidad de aminoácidos (<u>L</u> ow <u>C</u> omplexity <u>D</u> omain).
LCST:	temperatura inferior crítica de cosolubilidad (<u>L</u> ower <u>C</u> ritical <u>S</u> olution <u>T</u> emperature)
LLPS:	separación macromolecular de fases (<u>L</u> iquid- <u>L</u> iquid <u>P</u> hase <u>S</u> eparation).
M:	mecanoestable (<u>M</u> echanostable).
MBD:	dominio de unión a microtúbulos de tau (<u>M</u> icrotubule <u>B</u> inding <u>D</u> omain).
MCS:	sitio de clonaje múltiple (<u>M</u> ultiple <u>C</u> loning <u>S</u> ite).
MD:	simulaciones de dinámica molecular (<u>M</u> olecular <u>D</u> ynamics).

NM:	no mecanoestable (<i>Non Mechanostable</i>).
NMR:	resonancia magnética nuclear (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>).
pFS-2:	plásmido para espectroscopía de fuerza-2 (<i>plasmid for Force Spectroscopy-2</i>).
PHF:	filamentos helicoidales apareados (<i>Paired Helical Filaments</i>)
NP:	proteína neurotóxica (<i>Neurotoxic Protein</i>).
QBP1:	péptido de unión a poliglutamina-1 (<i>Poly-Q Binding Peptide 1</i>)
RC:	ovillo estadístico (<i>Random Coil</i>).
RMSF:	fluctuación cuadrática media (<i>Root Mean Square Fluctuation</i>).
SMD:	dinámica molecular guiada (<i>Steered Molecular Dynamics</i>).
SMFS:	espectroscopía de fuerzas monomolecular (<i>Single-Molecule Force Spectroscopy</i>).
RT:	temperatura ambiente (<i>Room Temperature</i>)
SF:	filamentos rectos (<i>Straight Filaments</i>)
TEM:	microscopía electrónica de transmisión (<i>Transmission Electron Microscopy</i>).
ThT:	tioflavina-T (<i>Thioflavin-T</i>).
Ubi:	ubiquitina portadora.
VAMP2:	proteína de membrana-2 asociada a vesícula (<i>Vesicle-Associated Membrane Protein 2</i>).
WLC:	cadena gusaniforme (<i>Worm-Like Chain</i>).

NANOMECÁNICA DEL MONÓMERO DE TAU Y DESARROLLO DE UNA NUEVA ESTRATEGIA PARA SU ESTUDIO

Las taupatías pertenecen a un grupo de enfermedades neurodegenerativas caracterizadas por la agregación amiloide patológica de la proteína tau. Dado que está involucrada en un gran número de demencias, de las que la Enfermedad de Alzheimer es la más conocida, la comunidad científica ha invertido un gran esfuerzo en su estudio. Desde que fue aislada por primera vez en 1975, se han realizado grandes avances en la comprensión de su papel fisiológico y patológico, habiéndose propuesto diferentes aproximaciones terapéuticas para inhibir su agregación. Sin embargo, sus complejas características estructurales (similares a las de otras proteínas neurotóxicas) la hacen una proteína con la que es muy difícil de trabajar y que, por tanto, dificultan su estudio. Como consecuencia de esta situación, los mecanismos moleculares que desencadenan la agregación patológica de tau aún no han sido descubiertos, lo que se encuentra obviamente vinculado a la carencia de un tratamiento frente a su agregación amiloide.

La espectroscopía de fuerzas de molécula individual basada en la microscopía de fuerzas atómicas (AFM-SMFS) es una técnica monomolecular que, en combinación con la ingeniería de proteínas, ha permitido que el campo de la “nanomecánica de proteínas” responda a preguntas que hasta ahora no podían ser abordadas. El estudio nanomecánico de tau a nivel de su monómero analiza su comportamiento estructural antes de la agregación y permite discernir aquellos cambios conformacionales primarios subyacentes a dicha formación de amiloide, pudiendo establecer una diana molecular hacia la que dirigir la intervención farmacológica. En esta tesis, gracias al desarrollo del vector pFS-2, específico para el estudio nanomecánico del monómero de Proteínas Intrínsecamente Desordenadas (IDPs), como es el caso de tau, se ha conseguido un exhaustivo análisis comparativo de tau *wt* y los mutantes proagregantes $\Delta 280K$ y P301L, causantes de demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17, en diferentes medios de agregación. Nuestros resultados demuestran que la pérdida de polimorfismo conformacional está directamente relacionada con la agregación, y establecemos un modelo en el que la pérdida de contactos intramoleculares dejaría a los monómeros expandidos permitiendo la interacción entre ellos para formar el dímero de nucleación amiloide. Por otra parte, se consigue discernir el diferente papel de ambas mutaciones en la modulación del comportamiento del monómero.

Finalmente debemos destacar que el polimorfismo de tau, y en general las proteínas amiloides, genera registros muy heterogéneos y complejos cuyas señales, además, pueden aparecer entremezcladas con los marcadores de monomolecularidad a lo largo del espectro. Esta situación generó muchas dificultades en el análisis, que lo hacen muy dependiente de experto, razón por la cual se ha desarrollado una nueva estrategia para hacer más eficiente y simplificar futuros estudios nanomecánicos de las IDPs en general y de los amiloides en particular. En base a la idea de la protección mecánica de la proteína bajo estudio que representa el fundamento del vector pFS-2, hemos implementado el uso de la cohesina c8C de la proteína modular escafoldina CipC como nuevo módulo portador, cuya estabilidad mecánica es superior a la de los módulos marcadores de monomolecularidad comúnmente utilizados. De esta forma, se consigue que la señal (picos de fuerza) de la proteína problema salga al final de los registros, lejos de la ruidosa zona proximal y tras el módulo portador que actúa como reportero. Esta estrategia permite eliminar la laboriosidad, esfuerzo y falibilidad para investigadores no-expertos en el campo asociada a la selección de registros válidos y a la asignación de picos de fuerza.

Parte I

INTRODUCCIÓN

1.1 Estructura de proteínas

1.1.1 Plegamiento

La célula ha sido conceptualizada como una fábrica que contiene una elaborada red de maquinaria fuertemente interconectada, donde las diferentes máquinas serían las proteínas. Esta comparación es debida a que cada vez que se lleva a cabo una función biológica, un ensamblaje de proteínas interacciona con eficiente coordinación con otros complejos de proteínas. Por otro lado, la tarea que cada proteína puede realizar viene determinada por su estado nativo, que hace referencia a su geometría, la cual es operativa y funcional[1].

Según el denominado “dogma” central de la biología molecular, piedra angular de la biología celular, una determinada secuencia de ADN de un gen, es transcrita a ARN mensajero, y posteriormente traducida a una cadena secuencial de residuos de aminoácido (polipéptido). Éste es el nivel más básico de la estructura de una proteína, la llamada estructura primaria, y es en este punto donde comienza el plegamiento y sobre el que se basan sus niveles de organización más elevados. El orden definido de estos aminoácidos va a determinar los tipos de interacciones intramoleculares que posteriormente se establezcan. La estructura secundaria hace referencia a conformaciones regulares locales; la terciaria, es la forma tridimensional de la proteína completa; y la cuaternaria, que se aplica a los casos donde intervienen más de un polipéptido, hace referencia a ordenamientos espaciales locales de las subunidades para formar un complejo proteico. Por ejemplo, la clase más sencilla de estructura cuaternaria sería un dímero, ya que consiste en la interacción intermolecular de dos subunidades idénticas. El desciframiento del código genético, es decir, la búsqueda de la relación existente entre las 64 posibles combinaciones de las cuatro bases de ADN en grupos de tres y las secuencias de los 20 “aminoácidos” (nótese que la prolina en realidad es un iminoácido) de las proteínas, es una cuestión fundamental que ya ha sido respondida hace tiempo; sin embargo, la **decodificación de las reglas del plegamiento proteico** es un reto que la ciencia aún no ha sido capaz de responder[2].

El plegamiento de una proteína globular ocurre en una escala de tiempo de milisegundos o incluso menor. Si se considera una proteína pequeña de 100 residuos aminoacídicos, en la que cada residuo fuese capaz de adoptar tres conformaciones distintas, y asumiendo que el tiempo mínimo que necesita una conformación para transformarse en otra es de 10^{-13} segundos, esta proteína necesitaría $1,6 \cdot 10^{27}$ años para adquirir su estructura nativa. Ésta es la llamada “**paradoja de Levinthal**” [3], que

implica la idea de que el plegamiento de las proteínas no se realiza por la búsqueda al azar de la estructura. La “**Hipótesis Termodinámica**” de Anfinsen postulaba que, de todas las conformaciones posibles que una proteína puede adquirir, ésta se decanta por la que menos energía consume dentro de la célula, sugiriendo que la clave estaba en el ahorro energético. De este modo, el plegamiento sería espontáneo y termodinámicamente favorable, pues la estructura nativa de la proteína en su medio fisiológico sería aquella cuya energía libre de Gibbs fuese la menor [4]. En los modelos del “**paisaje energético**” se representa la energía de una proteína cuya forma se asemeja a la de un embudo, siendo su profundidad dicha energía libre y la anchura representaría la entropía. La cadena polipeptídica en su estado desnaturalizado se encontraría en la parte superior del embudo y la estructura nativa en la parte inferior. Cuando la proteína está desplegada se encuentra formando un ovillo estadístico con libertad de rotación, y que fluctúa continuamente entre un gran número de conformaciones extendidas. A medida que se van formando contactos intramoleculares, la proteína se iría plegando y bajando por el embudo, pudiendo seguir diferentes rutas (siempre la de menos energía) dependiendo de la conformación en la que se encuentre el estado desplegado. El número de conformaciones que puede adoptar se irían reduciendo progresivamente hasta alcanzar finalmente el mínimo energético. A este modelo se le han añadido estrechas vías que conducen hasta el estado nativo, además de barreras y trampas cinéticas donde el polipéptido puede caer. Al tratarse de mínimos energéticos locales, las proteínas permanecerían allí en un estado metaestable, necesitando un aporte de energía para poder salir de él, que podría provenir de parte de las denominadas **chaperonas moleculares**[5] (Figura1-1).

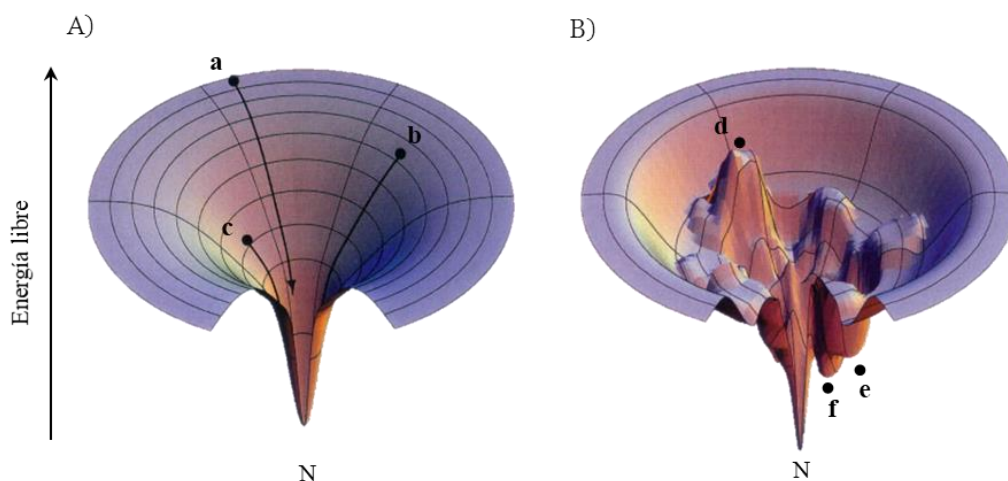


Figura 1-1. Modelos de paisaje energético de una proteína globular [5]. A) Paisaje energético ideal en forma de embudo, donde “a”, “b” y “c” representan distintas rutas de plegamiento

dependientes de la conformación inicial de partida. **B)** Modelo más complejo donde se añaden trampas cinéticas, barreras energéticas y rutas estrechas (“canalizadas”) que conducen hasta el estado nativo. “e” sería una conformación inaccesible; “f” y “g” son estados malplegados y “N” el estado menor energía, la estructura nativa.

Del mismo modo que las condiciones fisiológicas son necesarias para alcanzar la estructura nativa de la proteína haciendo que este proceso quede termodinámicamente favorecido, la estructura terciaria de una determinada cadena polipeptídica puede variar bajo la influencia de ciertas condiciones. Además, el cambio de un solo residuo de aminoácido puede afectar significativamente al plegamiento, llegando incluso a impedirlo en algunos casos extremos [6].

1.1.2 Proteínas Intrínsecamente Desordenadas

En los años 90 se descubrió que una gran fracción del genoma de algunos organismos codifica para proteínas que no forman ninguna estructura tridimensional y que sin embargo desempeñan importantes funciones celulares. Más de un tercio de las proteínas eucariotas contienen regiones desordenadas que comprenden más de 30 residuos. Estructuralmente, el rango de las denominadas Proteínas Intrínsecamente Desordenadas (IDPs, de sus siglas en inglés) abarca desde polipéptidos completamente desestructurados (**ovillos estadísticos** o *random coil*, RC), formas parcialmente estructuradas (**glóbulos nativos pre-fundidos**), o incluso conjuntos desordenados compactos que pueden contener una cantidad de estructura secundaria significativa (**glóbulos nativos fundidos**)[7].

La relevancia funcional de este tipo de proteínas ha sido ampliamente demostrada. La variedad de funciones que desempeñan estas proteínas es muy amplia, incluyendo el control del ciclo celular, la regulación transcripcional y traduccional o modulación de la actividad o del ensamblaje de otras proteínas. Una estructura flexible ofrece ventajas que no se encuentran en una proteína rígida. Algunos ejemplos son: proveer de una mayor superficie de interacción que las proteínas globulares de una longitud similar, capacidad de acoplamiento e interacción con diferentes proteínas diana o posibilidad de unión a sus ligandos con una alta especificidad y baja afinidad. La mayoría de las IDPs sufren una transición en su estructura de desordenadas a ordenadas para poder realizar su función, y muchas de ellas son reguladas por modificaciones post-traduccionales[7].

Las IDPs habitualmente no pueden plegarse espontáneamente, sino que lo hacen con la unión a su ligando siempre y cuando la energía libre del complejo sea

menor que las energías libres de las proteínas antes de la interacción. Sin embargo, es más común que sólo una parte de la IDP, un elemento específico de reconocimiento, sea el que esté vinculado a estos procesos de unión y plegado. Estos dominios de unión tienen preferencia en asociarse con secuencias similares, por lo que la probabilidad de interacción entre dianas fisiológicas aumentará si se aumenta la concentración de al menos una de ellas. De este modo, la representación de la energía libre de una IDP es mucho más compleja que la de una proteína estructurada. En este caso, los mínimos energéticos se alcanzarían al interactuar con sus ligandos fisiológicos o por autopolimerización [6] (**Figura 1-2**).

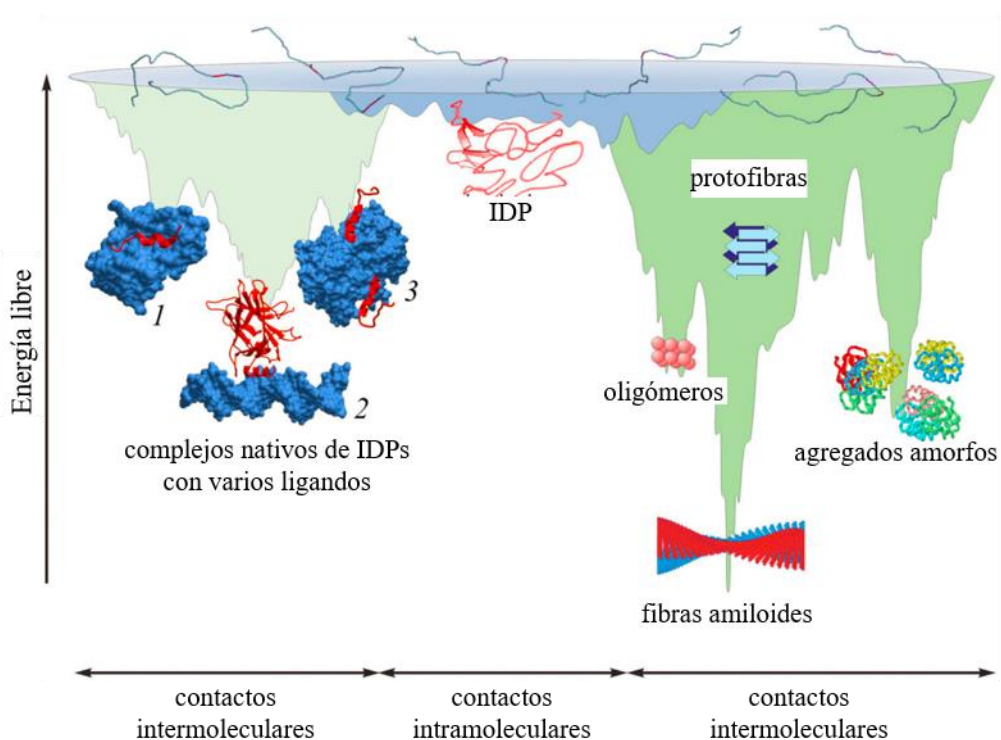


Figura 1-2. Paisaje energético de una IDP [6]. Muchas proteínas nativas no tienen una estructura globular en solución. Los segmentos desordenados de estas proteínas pueden adquirir estructura al interactuar específicamente con sus ligandos naturales, formando complejos con mínimos energéticos más pronunciados que los de las proteínas aisladas (1, 2 y 3). Por otro lado, contactos intermoleculares pueden darse entre ellas mismas, adquiriendo mínimos energéticos por la formación de agregados amorfos o estructuras ordenadas como los oligómeros y fibras amiloides.

1.1.3 Malplegamiento

Las IDPs están siempre “preparadas” para formar interacciones intermoleculares, ya que un segmento desunido de una IDP posee una fuerte habilidad

para interactuar con sus ligandos naturales y formar complejos nativos. Su flexibilidad les permite responder mejor a cambios en el medio, pero también las hace más susceptibles a un comportamiento aberrante. Un desbalance (por ejemplo, un aumento) en la concentración de proteína, mutaciones puntuales, modificaciones post-traduccionales que regulen el estado unido/desunido, cambios en su vida media, etc. son condiciones que pueden generar malplegamiento e interacción inespecífica con otras proteínas causando agregados amorfos o agregados ordenados, como las denominadas **fibras amiloides** (Figura 1-2).

Las fibras amiloides han estado asociadas desde su descubrimiento a múltiples patologías. Pueden tener diversos orígenes, pero todas presentan una morfología similar cuyo núcleo siempre tiene la misma estructura, la llamada **espinas cruzada β** (*cross- β spine*, en inglés). En ella, un número de láminas- β conforma el protofilamento, extendiéndose paralelamente al eje mientras que sus hebras- β se disponen perpendicularmente al eje de la fibra. Con el giro de las hebras- β , las láminas- β giran alrededor de un eje helicoidal común que coincide con el eje del protofilamento. Estas fibras son las especies insolubles finales de la **cascada de agregación amiloide**. Por otra parte, en esta ruta existen unos complejos intermedios que son considerados las especies más tóxicas, los denominados **oligómeros**. Se trata de especies amiloides solubles formadas por unas pocas unidades de monómero y, en general, son estructuralmente más heterogéneos y metaestables que las fibras. Son capaces de interactuar con un gran número de especies moleculares, causando toxicidad por varios mecanismos. Entre sus dianas aberrantes se incluyen los fosfolípidos de las bicapas, receptores de proteína, proteínas solubles, ARNs y metabolitos pequeños, siendo todos o la mayoría de ellos susceptibles de causar daño y muerte celular[8, 9].

Sin embargo, no todas las especies amiloides son tóxicas. Recientemente se ha demostrado la existencia de proteínas **amiloides funcionales**, encargadas de la formación de melanina, almacenaje de hormonas tróficas, consolidación de memoria o formación de gránulos de ARN[10].

A pesar de las características fisicoquímicas de las IDPs, la agregación patológica amiloide no suele ocurrir en condiciones fisiológicas ya que se ha desarrollado una red de maquinaria encargada del correcto plegamiento y degradación de proteínas. Desafortunadamente, en humanos, la edad es el mayor factor de riesgo para que se rompa este equilibrio del ciclo de las proteínas (**proteostasis**). Con la edad, los niveles de chaperonas tienden a reducirse ya que quedan secuestrados por el incremento de proteínas agregadas y porque la expresión de un 30% de ellas queda reducida en individuos de avanzada edad. Además, hay un descenso en la actividad

del sistema ubiquitina-proteasoma, al mismo tiempo que ocurre un descenso tanto de la macroautofagia como de la autofagia mediada por chaperonas. De este modo, **la acumulación de agregados de proteínas relacionadas con la edad es tanto un efecto como una causa del deterioro de la proteostasis**, conduciendo a un círculo vicioso que en última instancia acaba por colapsar. Este fenómeno está asociado a un gran número de enfermedades humanas, entre las que se incluyen la diabetes tipo 2 y varias **enfermedades neurodegenerativas** como la Enfermedad de Alzheimer (EA, de sus siglas en inglés), de Parkinson, de Huntington o la demencia frontotemporal.

1.1.4 Modelos de formación de amiloide

La comprensión de los aspectos más importantes de la conversión de las proteínas de sus estados nativos a fibras amiloides se ha convertido en un tema de investigación candente abordado por muy diversas disciplinas. Una de las principales razones para esta profusión de grupos es el poder desarrollar terapias que sean capaces de bloquear el proceso en alguno de sus estadios y poder así intervenir farmacológicamente en enfermedades que hasta ahora no tienen cura.

La formación de fibras amiloides puede ocurrir a través de múltiples estados intermedios y vías. Uno de los mecanismos más ampliamente aceptados para explicar el ensamblaje de monómeros en oligómeros es el llamado crecimiento por nucleación ("*nucleation growth*", en inglés)[11]. En él, el monómero sufre un cambio de conformación originando un monómero malplegado rico en estructura- β que se convierte en un monómero amiloide-competente que actúa como núcleo. Este núcleo puede ser definido como la especie menos estable termodinámicamente de las especies en solución, que actuaría como molde para el crecimiento rápido del agregado amiloide a través de la asociación de más monómeros. Alternativamente, el núcleo puede ser también definido como el mínimo agregado necesario para que la *ratio* de asociación exceda la de disociación.

Tras postularse este modelo, el concepto de núcleo fue investigado en mayor detalle y se propusieron otros modelos. En el modelo de **conversión conformacional nucleada** ("*nucleated conformational conversion*", en inglés)[12], los monómeros desplegados comienzan a autoensamblarse, dando lugar a un complejo tipo oligómero sin estructura estable. Este complejo sufriría una reorganización estructural, dando lugar a un oligómero amiloide que es el que actuaría como núcleo desencadenando rápidamente la agregación. Los siguientes complejos desordenados adquirirían la

conformación amiloide por interacción con los extremos agregados, a través de un mecanismo de **ajuste inducido**.

En este proceso, el complejo oligomérico desestructurado inicial se caracteriza por ser flexible, inestable y sin la estructura- β que caracteriza al típico oligómero amiloide y que suele teñirse con colorantes típicos como la tioflavina (ThT) y el rojo Congo (CR, de sus siglas en inglés). Estos colorantes típicos del amiloide no se unen a ellos. Cuando la agregación continúa y se da el reajuste conformacional, se originan especies con estructura- β , generalmente antiparalela y con baja unión a ThT y RC. Con el avance de la agregación, la subsecuente reorganización incluye un incremento en el tamaño de los oligómeros, en su estabilidad, su compactación, en la regularidad de la estructura en lámina- β antiparalela y la aparición de un núcleo hidrofóbico[13]. Esto viene acompañado por un descenso en las fluctuaciones dinámicas, en la exposición de grupos hidrofóbicos y en la superficie del oligómero en relación al número de monómeros. Estos cambios están relacionados con un descenso en la toxicidad, y pueden ocurrir a través de múltiples estados oligoméricos o simplemente como un proceso de dos estados[14].

Estos dos modelos de agregación amiloide difieren en un gran número de aspectos. Mientras que en el del crecimiento nucleado, el monómero interacciona directamente con el núcleo y éste podría ser tan pequeño como un monómero, en el *nucleated conformational conversion*, tanto el núcleo como las unidades de ensamblaje son los oligómeros. Por otra parte, en el primer modelo el paso limitante es la formación del núcleo, mientras que en el segundo modelo los oligómeros se forman rápidamente tras superar el paso limitante, que sería la conversión del “oligómero” desestructurado en oligómero amiloide. Cada modelo está apoyado por diferentes estudios.

En los modelos de agregación de una proteína, la formación de oligómeros podría ocurrir a través de diferentes mecanismos, combinando en un mismo escenario rutas de agregación que aparentemente compiten (**Figura 1-3**). La ruta más accesible dependería de la naturaleza del monómero, de las condiciones de la solución –como son el pH o la concentración de proteína- o de mutaciones introducidas. La diferente ruta escogida implicaría diferencias en la morfología, dimensiones y compactación de los oligómeros resultantes. Si la estructura amiloide-competente tiene suficiente grado de fluctuaciones dinámicas y grupos hidrofóbicos expuestos al solvente, la formación de complejos oligoméricos desestructurados ocurriría con facilidad [14]. De este modo, se ha mostrado que péptidos hidrofóbicos tienden a formar este tipo de complejos, mientras que péptidos que tienden a establecer puentes de hidrógeno intermoleculares a través de sus cadenas laterales forman rápidamente núcleos ricos en estructura- β .

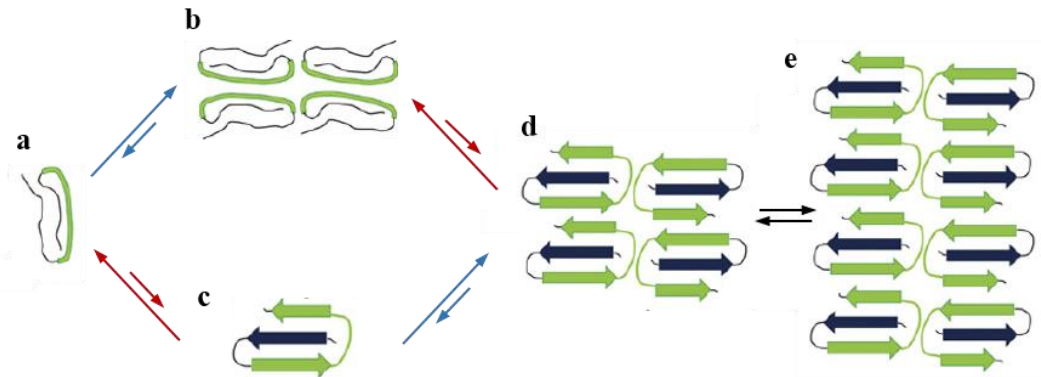


Figura 1-3. Mecanismos de agregación amiloide. “a” es un monómero desplegado, cuyo segmento propenso a la agregación queda expuesto al solvente y puede establecer interacciones intermoleculares, formando oligómeros sin estructura “b”. Estos agregados tempranos pueden convertirse posteriormente en oligómeros amiloides solubles competentes para la nucleación “d” y posterior formación de fibras “e”. En una ruta alternativa, “a” se convierte en un monómero competente amiloide “c” que actúa como molde para la formación del oligómero “d”. A esta ruta se le suele llamar **crecimiento por nucleación** mientras que a la que incluye los estadios a → b → d se la refiere como mecanismo de **conversión conformacional nucleada**. Las flechas rojas representan las etapas limitantes de cada vía, mientras que las flechas azules refieren a pasos rápidos de la agregación[14]. (Modificada de Bemporad y Chiti, 2012).

1.1.5 Estructura de los oligómeros

La existencia de rutas paralelas en la agregación de proteínas y la metaestabilidad de varias especies que se acumulan durante el proceso generan multiplicidad de oligómeros, normalmente con muy diversas características. La cuestión del polimorfismo de oligómeros no sólo es relevante desde el punto de vista de la descripción de su estructura y de los mecanismos de formación de oligómeros y fibras, sino que también tiene muchas implicaciones en biología. De hecho, se ha encontrado que la expresión de diferentes mutantes de **β -amiloide** ($A\beta$, principal proteína implicada en EA) en *Drosophila* conduce a diferentes patologías y que diferentes oligómeros de **α -sinucleína** (principal proteína implicada en la enfermedad de Parkinson) y $A\beta$ causan toxicidad en cultivos a través de diferentes mecanismos[14].

1.1.6 Orgánulos sin membrana: separación macromolecular de fases en la célula

Recientemente se ha descubierto que algunas IDPs están implicadas en la separación de fases en el medio acuoso celular. De esta manera se permite la organización de

muchas reacciones biológicas en compartimentos que no tienen membrana, donde se provee de ambientes en los que determinadas reacciones químicas ocurren constantemente. Algunos de estos ejemplos son: el nucleolo, que genera ribosomas en el núcleo; los centrosomas, que nuclean los microtúbulos; los cuerpos de Cajal, donde se forma el espliceosoma; o los gránulos de estrés (SG, de sus siglas en inglés), que pueden adoptar varias formas en diferentes condiciones de estrés[15].

La primera distinción entre la separación macromolecular de fases (*Liquid-Liquid Phase Separation*, LLPS, *liquid droplets*, microgotas u orgánulos sin membrana) y otros tipos de organización de proteínas es que las macromoléculas que componen los LLPS se pueden intercambiar con el citoplasma u orgánulos de alrededor (**Figura 1-4**). Las proteínas asociadas con las LLPS son muy dinámicas y pueden difundir dentro y fuera de las microgotas rápidamente, en el rango de segundos o decenas de segundos. La ratio de intercambio de las proteínas y ácidos nucleicos determina el tamaño de la microgota. Si se compara con complejos de proteínas plegadas, la composición de las LLPS es transitoria y puede sufrir una rápida formación o desintegración a través de pequeños cambios en concentraciones locales, estados químicos de los componentes o composición química o física del medio.

Estas *gotas* son mezclas de proteínas o proteínas con ácidos nucleicos que interaccionan. Las proteínas que forman estas estructuras son aquellas que contienen dominios con baja complejidad de composición aminoacídica (*Low Complexity Domains*, LCDs) que, en general, son típicos de las IDPs. Incluyen repeticiones en tándem de residuos de aminoácidos o motivos de estos residuos, como tractos de poliglutaminas y poliasparaginas. También se ha mostrado que las modificaciones post-traduccionales en estas proteínas pueden inducir a la separación de fases[16].

En la mezcla que se presenta en estas estructuras se dan interacciones heterogéneas que compiten entre diferentes tipos de moléculas y es esta heterogeneidad lo que previene de una transición a estados fibrilares. Su naturaleza puede ser explicada basándonos en la teoría de polímeros. Una microgota estaría formada por polímeros lineales, donde las unidades monoméricas son las IDPs. Las cadenas de los polímeros lineales están unidas mediante enlaces secundarios débiles (fuerzas de Van der Waals), permitiendo que se puedan mover unas con respecto a las otras bajo la influencia de tensiones externas relativamente pequeñas. En consecuencia, la rigidez de este tipo de polímeros es baja. Por el contrario, las propiedades de flujo están fuertemente influenciadas por el enmarañamiento de los monómeros (que no suelen estar presentes en la forma extendida, sino como RC). La compactación del polipéptido variará con la polarización producida por los

aminoácidos de carga opuesta. De este modo, pequeños cambios en la carga podrían cambiar un polipéptido de un estado a otro. Una manera de conseguir esto es a través de modificaciones post-traduccionales. La fosforilación de la serina, treonina y tirosina o metilación y acetilación de la lisina, provocan una adición de carga negativa o reducción de carga positiva. En relación con esto, estudios *in vitro* han mostrado que proteínas que contienen LCDs pueden sufrir una transición desde asociaciones débiles a reajustes fibrilares amiloides, y la evolución de este proceso puede ser acelerado *in vivo* por los mutantes naturales de estas proteínas, algunos de los cuales se sabe que son patogénicos[16].

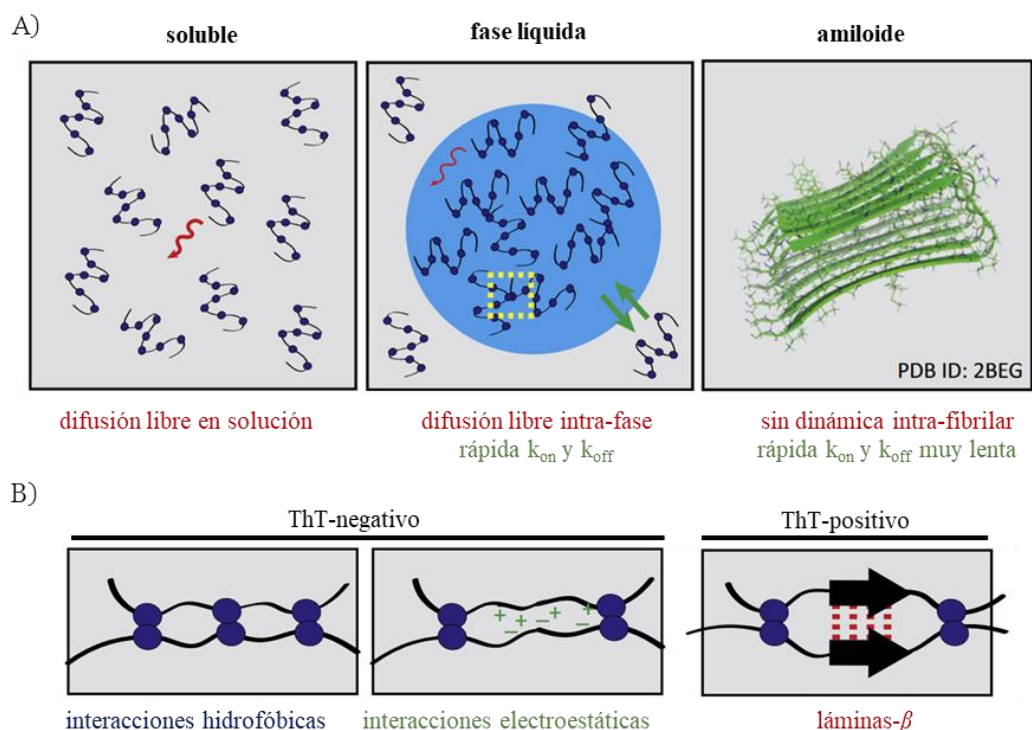


Figura 1-4. Fases proteicas intracelulares y sus características. A) Las proteínas *solubles* difunden libremente en el cito- o nucleoplasma, como indica la flecha roja. Algunos tipos concretos de proteínas tienden a formar LLPS bajo condiciones específicas. Las moléculas individuales en la *microgota* formada pueden difundir rápidamente por el interior de la fase (flecha roja) o intercambiarse con monómeros solubles que se encuentren fuera (flechas verdes). En las *fibras amiloides*, la incorporación de monómeros solubles en una fibra preexistente ocurre rápidamente, y apenas existe disociación de los monómeros que ya conforman la fibra. B) Las proteínas que desencadenan una separación de fases presentan residuos hidrofóbicos (especialmente aromáticos). Las interacciones hidrofóbicas/de apilamiento son las principales responsables de un colapso hidrofóbico inicial que acerca los monómeros entre sí. En algunos casos, interacciones adicionales como las electroestáticas, contribuyen o estabilizan la separación de fases[17].

1.2 Proteína tau

Tau es una proteína abundante en el sistema nervioso central y periférico. Es una IDP típica y en ciertas situaciones patológicas, sufre algunas modificaciones, principalmente a través de la fosforilación, pudiendo causar la generación de agregados amiloides aberrantes que son tóxicos para las neuronas. Este proceso ocurre en un número de desórdenes patológicos conocidos en su conjunto como taupatías, siendo el más conocido el de EA[18].

Se expresa predominantemente en neuronas y es miembro de la familia MAP2/tau de proteínas asociadas a microtúbulos, contribuyendo a la polimerización y estabilización de los mismos en condiciones fisiológicas. Asimismo, participa en la expansión de las neuritas, en la regulación del transporte axonal o en la transducción de señales a través de la modulación de la actividad de las quinasas Src y Fyn y de la proteína PSD-95. Por otro lado, en la región de organización nucleolar de la célula, podría estar implicada en reparación de DNA y protección frente a choque térmico[19].

El gen humano de tau se localiza en el cromosoma 17 donde ocupa unas 100 kb y contiene al menos 16 exones. Una vez transcrito sufre maduración alternativa, dando diferentes tipos de ARNm [20]. La traducción de los mismos conlleva la producción de las distintas isoformas de tau. La expresión de las distintas isoformas ocurre durante el desarrollo del cerebro. En el sistema nervioso central, la maduración alternativa de los exones 2, 3 y 10 origina la aparición de seis isoformas (**Figura 1-5**). Estas isoformas cerebrales se han dividido en dos grandes dominios: el dominio de proyección que contiene el extremo amino-terminal y que corresponde con dos tercios de la molécula, y el carboxilo-terminal, que pertenece al tercio restante y contiene los dominios de unión a microtúbulos (MBD, de sus siglas en inglés). Se han propuesto distintos papeles para el dominio de proyección, incluyendo el de determinador de espacio entre los microtúbulos axonales, interacciones con otras proteínas del citoesqueleto o unión a cationes metálicos, debido a la presencia de residuos ácidos. Se han identificado otros motivos en esta región incluyendo la secuencia KKXK, relacionada con la unión de heparina, o motivos PPXXP o PXXP en la región rica en prolinas que debe participar en la interacción de tau con proteínas que contienen dominios SH3. Por consiguiente, esta región participaría en la unión de tau a proteínas asociadas a la membrana plasmática[21].

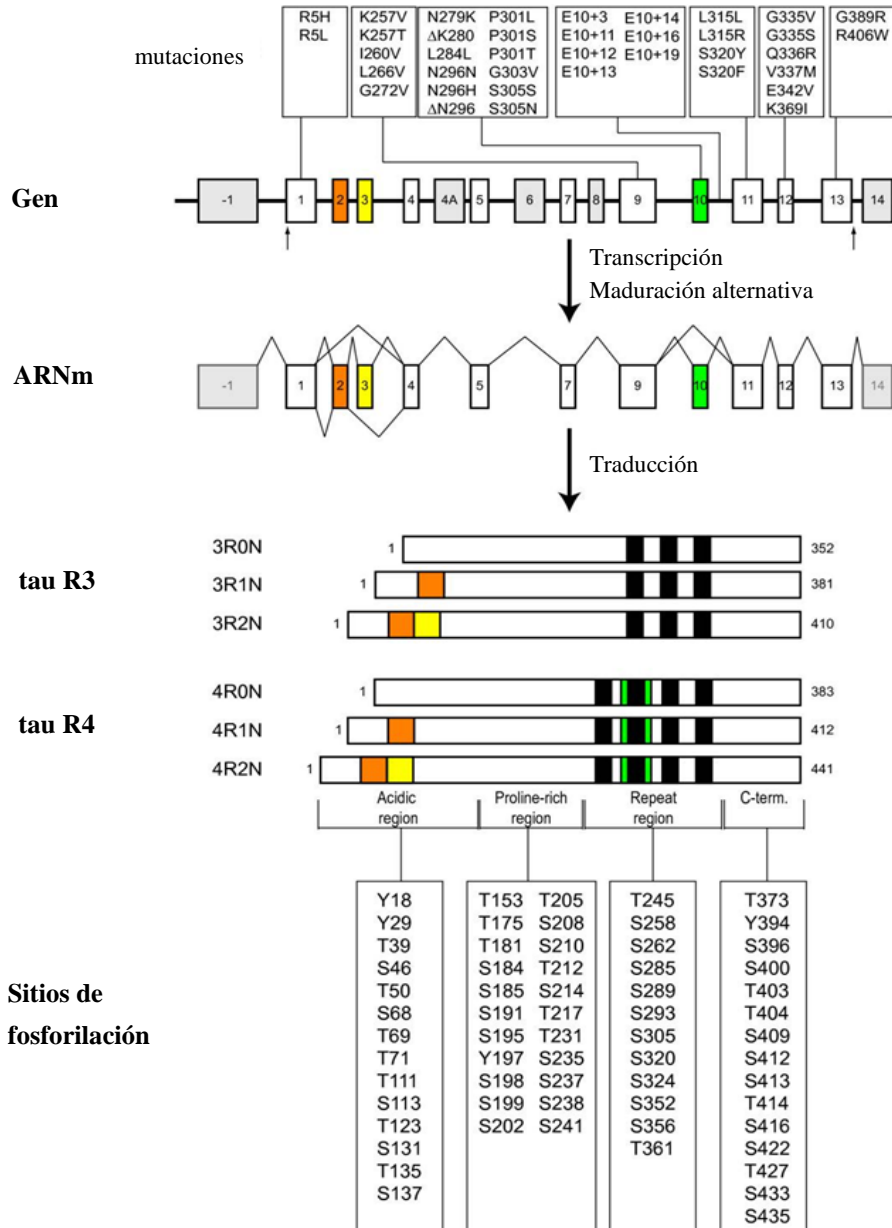


Figura 1-5. Representación esquemática del gen humano de tau, ARNm e isoformas proteicas. Las cajas blancas representan los exones constitutivos y las grises y de color aquellos que sufren maduración alternativa. Los exones 2, 3 y 10 generan seis isoformas diferentes. La segunda repetición, codificada por el exón 10, aparece resaltada en verde. En el panel inferior se indican los lugares de fosforilación conocidos *in vitro* e *in vivo*[22].

Tau es rica en residuos polares, lo que la convierten en una proteína altamente soluble con escasa estructura secundaria incluso cuando se une a los microtúbulos. El MBD está positivamente cargado en general, favoreciendo su interacción con las superficies cargadas negativamente de los microtúbulos. La maduración alternativa del exón 10 origina que el MBD contenga tres (tau R3) o cuatro (tau R4) pseudo-repeticiones, cada una de 31 o 32 residuos. Tau R4 se une a los microtúbulos con mayor afinidad y puede reemplazar la unión previa de R3 con los microtúbulos. Tras un primer análisis de su secuencia, podría sorprender que esta proteína forme estructuras amiloides. Sin embargo, en las repeticiones dos y cuatro se encuentran dos motivos hexapeptídicos que tienen una alta propensión a formar lámina- β : ²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ y ³⁰⁶VQIVYK³¹¹. Se ha demostrado que estos motivos son fundamentales en el proceso de agregación, actúan como mediadores de interacciones intermoleculares entre monómeros y forman el núcleo de los filamentos. La agregación de la proteína tau completa *in vitro* es muy lenta debido a su carga, que la hace una proteína altamente soluble. Por tanto, en los estudios de agregación *in vitro* se tiende a usar la región proagregante MBD, ya que el proceso es más rápido sin las regiones flanqueantes[23].

De este dominio, las secuencias con mayor capacidad para unirse a los microtúbulos son las contenidas en la primera repetición, en la segunda, y en la región existente entre ellas. Tau contiene dos cisteínas, C291 y C322, localizadas en las repeticiones R2 y R3, respectivamente. La oxidación de las mismas tiene una fuerte influencia en la habilidad de formar fibras amiloides. El estado de oxidación de las cisteínas y el número de repeticiones en MBD está fuertemente vinculado a la agregación, ya que C291 está presente solamente en la isoforma 4R. De este modo, mientras que la oxidación promueve la fibrilación de tau R3 a través de la formación de puentes disulfuro intermoleculares, la oxidación de tau R4 retrasa la agregación, debido a la formación de puentes S-S entre C291 y C322. Sin embargo, en los experimentos que suelen realizarse *in vitro* y en células, nos encontramos con condiciones reductoras, causando una agregación más eficiente en la isoforma R4. Cofactores polianiónicos como la heparina y ARN aceleran la agregación, posiblemente porque la interacción con tau compense las cargas positivas de MBD[24].

2.1 Tau forma LLPS

En un reciente estudio se ha demostrado que tau es capaz de formar orgánulos sin membrana[25]. La secuencia de residuos aminoácidos de tau es de baja complejidad y contiene sólo un número pequeño de residuos hidrofóbicos. Se ha visto

que la región más propensa a formar microgotas es la correspondiente al MBD. Cuando el MBD forma LLPS, la unión a ThT es muy baja, lo que indica la ausencia de una estructura- β rígida.

En un estado disperso monomérico de tau completa y MBD, sólo ocurren interacciones intramoleculares y no intermoleculares. Cuando tau se encuentra en las LLPS, los datos de NMR sugieren que se encuentra mayoritariamente desordenada, y que las repeticiones de tau interactúan débilmente entre ellas, pudiendo ser dentro de una misma proteína o entre diferentes moléculas. En términos generales, en las LLPS formadas por MBD, se da una red molecular débil de los elementos que promueven la agregación[25].

En este estudio se muestra cómo la temperatura es un factor limitante en la formación de LLPS por parte de tau. La dependencia de la temperatura está basada en la composición de su secuencia de aminoácidos. Mientras que un alto contenido en residuos de arginina favorece la separación de fases por debajo de una temperatura crítica, la presencia de residuos de lisina y los motivos P-X_n-G en IDPs se han asociado con una Temperatura Inferior Crítica de Cosolubilidad (LCST, de sus siglas en inglés). De acuerdo con esto, MBD contiene sólo un residuo de arginina, pero 19 residuos de lisina, además de un motivo PGGG conservado evolutivamente en los extremos C-terminales de cada repetición (**Figura 1-6**). En contraste con MBD, los dominios de proteínas que forman LLPS estudiados previamente son ricos en glutaminas/asparaginas y desencadenan la separación de fases sólo a bajas temperaturas (por debajo de 20 °C). La temperatura donde se produce un máximo de formación de LLPS para MBD es 42 °C, temperatura muy próxima a la fisiológica.

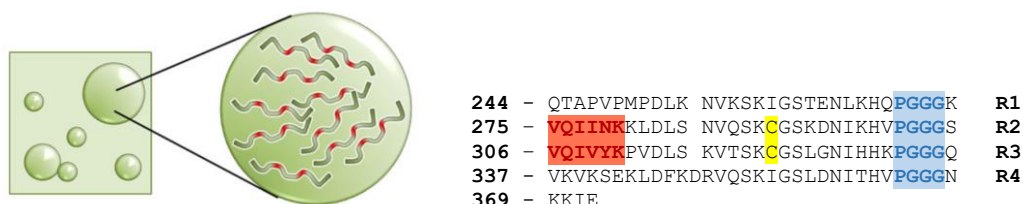


Figura 1-6. Representación esquemática de las repeticiones de tau en una LLPS. Los hexapéptidos hidrofóbicos proagregantes están marcados en rojo, los residuos de cisteína en amarillo y los motivos PGGG en azul[25].

Por otro lado, para la formación favorable de estas LLPS debe darse un medio en condiciones reductoras, baja concentración de sales, ausencia de heparina y, en

ausencia de fosforilación, grandes concentraciones de proteína. Cuando la quinasa MARK2 fosforila tau disminuye la concentración crítica para la separación de fases de 10 a 2 μM , concentración que es la estimada en las neuronas.

A través del proceso de separación de fases, la concentración local de MBD aumenta considerablemente y también aumenta el contenido en estructura- β de las repeticiones. Se causa un apiñamiento molecular de los elementos de tau que promueven el amiloide, aunque es necesaria la presencia de heparina para su formación[25].

2.1.1 Gránulos de estrés en el compartimento somatodentrítico

La función de tau en el compartimento somatodentrítico es desconocida. Recientemente, se ha comprobado que TIA1 (proteína de unión a ARN que regula la formación de SG requiere de tau para su interacción normal con proteínas relacionadas con ARN.

La sobreexpresión de tau y su interacción con TIA1 aumenta considerablemente la formación de gránulos de ARN en condiciones basales y de estrés. La interacción promueve el desplegamiento de tau y posterior ensamblaje en SG, lo que resulta en la degeneración de procesos y expresión de marcadores apoptóticos en neuronas primarias. Las quinasas que van dirigidas a las prolinas de tau, conocidas por su papel en la regulación de asociación a los microtúbulos, también regulan la ruta SG. Por otro lado, la mutación P301L en tau provoca una aceleración en el ratio de formación de los SGs y un aumento significativo de su tamaño, pero sin alterarse el número de ellos presente en la célula [26].

2.2 Taupatías y FTDP-17

Las taupatías son un grupo de desórdenes donde la proteína tau se encuentra alterada, bien por modificaciones post-traduccionales (entre las que la fosforilación es la más frecuente), por una maduración alternativa anormal o por mutaciones en el gen, causando la aparición de agregados que causan toxicidad. Las taupatías comprenden un grupo de más de 20 desórdenes neurodegenerativos diferentes, siendo el más conocido EA, que se encuentra dentro de las taupatías secundarias donde la deposición de tau está asociada a otra proteína. En las taupatías primarias, la agregación de tau es el mayor rasgo neuropatológico, existiendo una extensa lista de ellas, entre las que se encuentran la enfermedad de Pick, la parálisis supranuclear progresiva, la degeneración corticobasal, la argirofilia granulosa, etc. [27].

Dentro de las taupatías primarias se encuentra la Demencia Frontotemporal con Parkinsonismo ligado al Cromosoma 17 (FTDP-17, de sus siglas en inglés). En ella, los pacientes presentan una atrofia frontotemporal, con pérdida neuronal, gliosis y cambios espongiiformes corticales en los lóbulos. Se trata de un desorden neurodegenerativo que no tiene tratamientos terapéuticos, sólo paliativos, y que presenta una mayor prevalencia en poblaciones más jóvenes que otro tipo de demencias, siendo el segundo tipo más común en personas menores de 60 años. Puede ser familiar de herencia autosómica dominante (35-50% de los casos), o esporádica. En el 40% de los casos de FTDP-17 familiar existen mutaciones de tau que causan su acumulación filamentosa e hiperfosforilada. Las lesiones neurofibrilares se correlacionan fuertemente con los déficits cognitivos, mostrando que la disfunción de tau es suficiente para causar neurodegeneración y demencia[28].

Existe una variabilidad significativa en los síntomas y patología de FTDP-17. Los mecanismos de progresión de la enfermedad difieren entre las distintas mutaciones e incluso dentro de la misma mutación, causando alteraciones a distintos niveles. Se ha sugerido que diferentes conformeros moleculares de tau están asociados a estas diferencias. Más de 50 mutaciones en tau han sido identificadas para esta patología, encontrándose la mayoría en MBD. Algunas mutaciones se han vinculado al aumento de la agregación, hiperfosforilación, defectos en la maduración alternativa del ARNm y un descenso en la interacción con los microtúbulos. Cuando ocurre un aumento en la agregación, no es sólo un parámetro el que se exagera, sino que también existen diferencias en la cantidad de proteína agregada, su cinética y morfología de los filamentos[29].

Las mutaciones $\Delta 280K$ y P301L son causantes de FTDP-17, y figuran entre las variantes que provocan una mayor formación de fibras. Su agregación *in vitro* de los fragmentos que contienen solo MBD causan predominantemente *filamentos helicoidales apareados* (PHF, de sus siglas en inglés) en el caso de $\Delta 280K$ y *filamentos rectos* (SF, de sus siglas en inglés) en el caso de P301L[30]. Éstos son los dos tipos de estructuras encontrados en AD[31] (**Figura 1-7**). Ambos mutantes se unen más débilmente a los microtúbulos que la variante *wt*. La mutación P301L es la más común en FTDP-17, causando una temprana aparición y desarrollo de la enfermedad, entre los 40-50 años. La lisina de la posición 280 parece jugar un importante papel a nivel bioquímico y de agregación, pues se trata de uno de los principales sitios de acetilación de la proteína y se encuentra en uno de los dos hexapéptidos responsables de la formación amiloide.

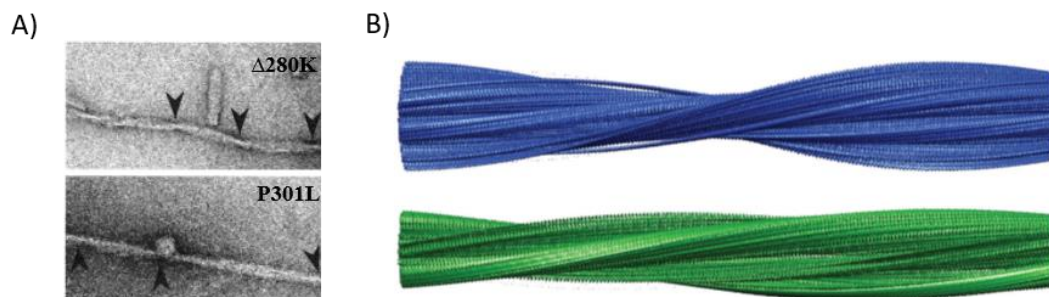


Figura 1-7. Estructura de los filamentos de tau. A) Microscopía electrónica de fibras de $\Delta 280K_MBD$ formando PHF y de P301L_MBD formando SF[30]. B) Reconstrucciones de Crio-Microscopía Electrónica de PHFs (azul) y SF (verde) de muestras obtenidas del cerebro de un paciente con AD[31].

El estudio de la agregación en sus primeras fases es crucial para entender el proceso de formación de amiloide e intentar comprender su heterogeneidad. En un estudio publicado en 2015[32] se utilizó fluorescencia de molécula individual para estudiar los primeros estadios en la agregación de tau *wt*, y las variantes $\Delta 280K$ y P301L.

En este trabajo se comprobó cómo ambos mutantes presentaban un pico máximo de población de oligómeros mucho antes que la variante *wt*, sugiriendo que el proceso de nucleación es más favorable para ellas. Sin embargo, en el momento de la reacción donde había más cantidad de oligómeros, la concentración de ellos era diferente en cada variante: los mutantes coincidían en que formaban más oligómeros que el *wt*, pero no en la misma proporción: $\Delta 280K$ presentaba una población 50 veces mayor que el *wt*, mientras que en P301L la proporción era de 3-4 veces mayor. Por otra parte, se estimó también el tamaño aparente de estos oligómeros en función del tiempo de incubación. El estudio describe que los oligómeros permanecen pequeños durante toda la reacción sin observar tamaños especialmente estables. Aunque si se observa las gráficas mostradas con más detenimiento, es posible obtener más información, como que existen diferencias en tamaño y variabilidad dentro de los oligómeros de cada especie (Figura 1-8).

Finalmente, los autores proponen un modelo de agregación para tau. Los datos no pueden ser explicados por un simple modelo de nucleación-polimerización, donde los oligómeros son tratados como pequeñas fibras. Por ello, los agregados oligoméricos son tratados de forma distinta a las fibras, introduciendo un paso adicional en la ruta de reacción, que es la formación de oligómeros no competentes. Para encajar este

modelo con los diferentes datos obtenidos en cada variante, se calcula la energía libre de activación para cada paso de la reacción[32].

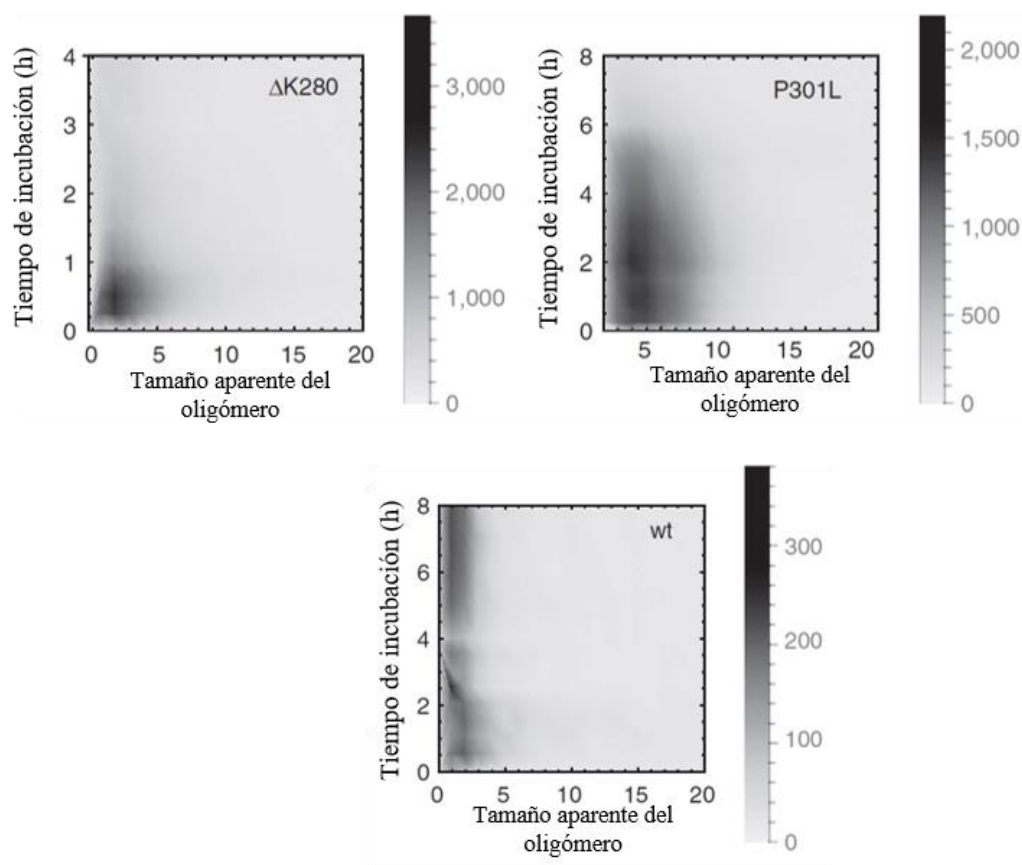


Figura 1-8. Análisis de la formación de oligómeros en tau. En las gráficas se muestra el número de puntos de densidad obtenidos por fluorescencia de molécula individual que muestran la evolución del tamaño aparente de MBD *wt* y mutantes a diferentes tiempos de incubación[32].

Este estudio aporta nueva información en los estadios previos a la formación de fibras en tau *wt* y dos de sus mutantes causantes de FTDP-17. Sin embargo, los mecanismos moleculares que ocurren justo al principio del proceso de agregación amiloide, es decir el comportamiento del monómero, aún no ha sido estudiado en profundidad. En este sentido, tenemos que mencionar que en 2011 se estudiaron por Microscopía de Fuerza Atómica en su modalidad de Espectroscopía de Fuerzas Monomolecular (*Single-Molecule Force Spectroscopy*, SMFS) varios fragmentos de tau *wt* [32]. Sin embargo, dado que no se utilizaron estrategias que eviten la contaminación de los datos por el ruido de la zona proximal (ver más adelante la discusión al respecto), que es inherente a la técnica, presumiblemente cabe esperar que se hayan cometido errores en la selección de los datos que posteriormente fueron

analizados, con lo que los resultados son cuestionables y las conclusiones podrían ser erróneas. Por todo ello, consideramos que el análisis inequívoco de la nanomecánica del monómero de tau es un estudio que aún está por hacer y es por ello que lo abordamos en la presente tesis.

1.1.7 Estudio de Proteínas Neurotóxicas por SMFS

Por todo lo argumentado anteriormente, el estudio del mecanismo molecular que desencadena la formación amiloide, es de vital importancia. Más concretamente, con vistas a descifrar los eventos que sufre el monómero de varias proteínas neurotóxicas (NP, de sus siglas en inglés), causantes o vinculadas a varias enfermedades neurodegenerativas amiloides, se analizó por SMFS las proteínas α -sinucleína, $A\beta$, poliglutaminas (y algunos de sus mutantes tóxicos proagregantes) y el prion de levadura Sup35[29].

AFM-SMFS

El Microscopio de Fuerza Atómica (AFM, de sus siglas en inglés) es una herramienta mecánico-óptica de nanomanipulación que mide fuerzas y distancias del orden de piconewtons y nanómetros, respectivamente. Aunque su aplicabilidad más extendida se basa en la obtención de imágenes topográficas de una muestra biológica mediante el barrido de su superficie, también ofrece la posibilidad de estudiar las propiedades mecánicas de proteínas individuales en su modo SMFS.

El AFM consta esencialmente de dos componentes: una cabeza sensora o micropalanca y un posicionador piezoeléctrico. La muestra se coloca sobre un portaobjetos funcionalizado, localizado sobre el posicionador piezoeléctrico. La cabeza sensora tiene una punta en su extremo, que entra en contacto con la muestra mediante el posicionador. Cuando este posicionador se retrae una distancia conocida (Δz_p) las moléculas que hayan podido resultar ancladas a ambos componentes se extienden y la micropalanca se flexiona (Δz_c) en relación a la resistencia al estiramiento de la molécula anclada. La micropalanca se comporta como un muelle que sigue la ley Hooke. Un láser rebota sobre la punta de esta micropalanca hasta un fotodiodo, reproduciendo el movimiento de la punta y generando una señal de voltaje que se traducirá en fuerza. La *fuerza* requerida para desplegar un dominio proteico (F_u , de sus siglas en inglés) se estima en función de la deflexión de la micropalanca (previamente calibrada en base al teorema de equipartición de la energía) y la *extensión* del dominio desplegado (incremento en la longitud de contorno, ΔL_c) se calcula en función del desplazamiento

del posicionador piezoeléctrico (**Figura 1-9**). De este modo, se generan las curvas fuerza-extensión características de estos experimentos, donde la F_u es la altura de los picos y ΔL_c se corresponde con la distancia desplegada, que se calcula ajustando a un modelo de física de polímeros a partir de la distancia que hay entre dos picos[33].

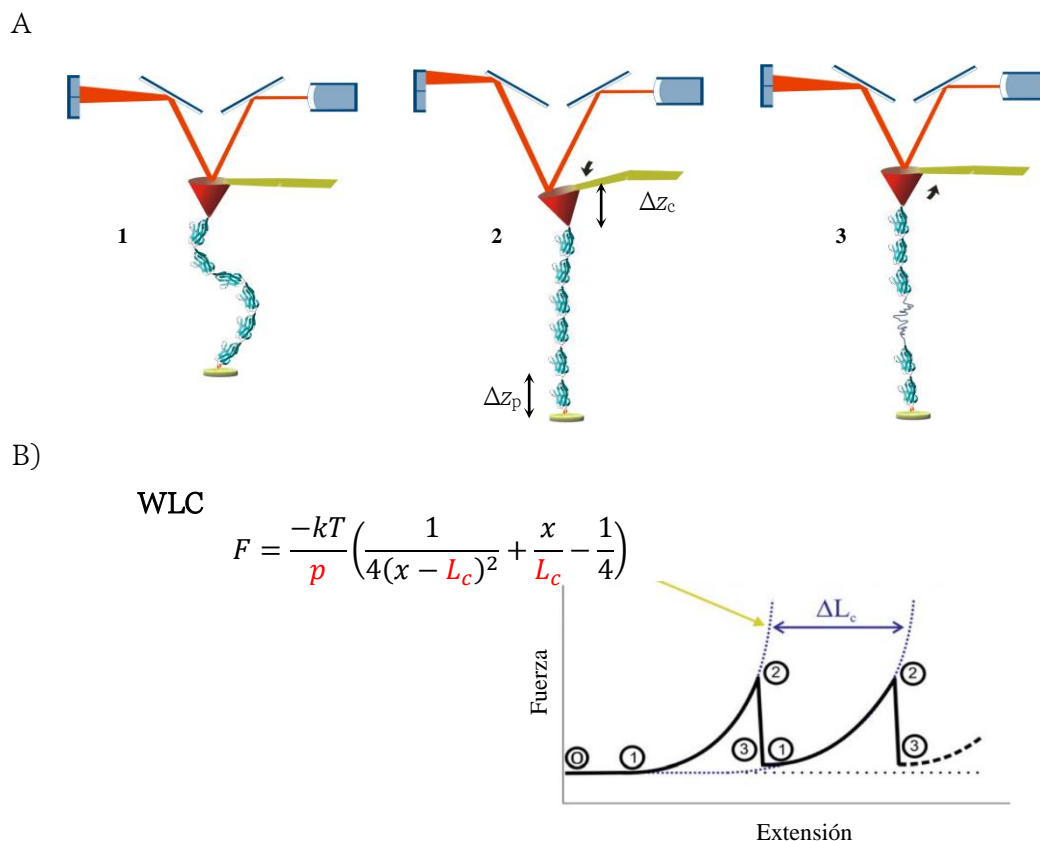


Figura 1-9. Despliegamiento mecánico de una proteína modular. A) Con el desplazamiento del posicionador piezoeléctrico (Δz_p) la molécula resiste a su estiramiento debido a su elasticidad entrópica, lo que causa una curvatura en la micropalanca (Δz_c , estados 1 y 2). Cuando el módulo con la menor energía libre en ese momento es desplegado, la ΔL_c de la proteína aumenta, disminuyendo la fuerza sobre la micropalanca (3). **B)** La elasticidad entrópica de las proteínas puede describirse por el modelo WLC de elasticidad de polímeros. Los parámetros p y ΔL_c pueden estimarse al ajustar las curvas de fuerza-extensión a este modelo (líneas azules punteadas). Los números se corresponden con los sucesos detallados en A[34].

La elasticidad de una cadena polipeptídica se suele describir por el modelo “Worm-Like Chain” (WLC) de elasticidad de polímeros[33]. Tiene dos parámetros que son ajustables: la longitud de persistencia (p), que define la flexibilidad del polipéptido, y la longitud del módulo desplegado ΔL_c , siendo 0,4 nm por cada aminoácido[35]. Los

valores de F_u y ΔL_c obtenidos tras el desplegamiento de una proteína globular son relativamente estables y suelen ajustarse de forma aproximada a una Gaussiana[34].

En los experimentos de AFM-SMFS los módulos que tienen una menor mecanoestabilidad tienden a desplegarse primero siguiéndoles aquellos cuya mecanoestabilidad es mayor; es decir, hay una jerarquía de fuerzas de desplegamiento. Esto genera que en los registros aparezcan primero los picos de menor fuerza seguidos de aquellos con valores más altos. Dado que las IDPs son desestructuradas en su forma nativa, su estudio en este tipo de ensayos resulta complejo, pues las estructuras transitorias que forman (polimorfismo conformacional) aparecerían en la zona proximal del espectro fuerza-extensión, región no fácilmente analizable por ser donde aparecen eventos múltiples (varias moléculas en paralelo) y picos de fuerza procedentes de la ruptura de interacciones inespecíficas. Para solventar este problema, en nuestro laboratorio se desarrolló un vector, el *Plasmid for Force Spectroscopy-2*, pFS-2 (**Figura 1-10, A**), donde se protege mecánicamente a la IDP en el interior de una proteína portadora[36]. Este vector consta de los siguientes elementos:

- a) Dos dianas para la purificación por afinidad. Una cola de histidinas (His-tag) en el extremo N-terminal y un Strep-tag en el C-terminal.
- b) Dianas para el anclaje de alta estabilidad: dos residuos cisteína para su unión covalente a la micropalanca recubierta de oro (a través de la formación de un enlace S-Au) y el His-tag, que se usa también para anclar la proteína a través de un enlace coordinado a cubreobjetos de vidrio funcionalizados con NTA-Ni²⁺.
- c) Cinco repeticiones de ubicuitina como marcadores de monomolecularidad. Una de las cuestiones más relevantes a tener en cuenta en este tipo de experimentos es contar con controles internos que nos permitan asegurar que las señales del registro que estamos analizando proviene de una única molécula. Esto se consigue con el uso de repeticiones de una misma proteína que genera un patrón periódico de dientes de sierra. La elección de la ubicuitina se debe a que es un referente en el campo de la nanomecánica, cuyas propiedades mecánicas son muy bien conocidas.
- d) Polipéptido N2B como espaciador. Es un fragmento de una IDP (no amiloidogénica) de la titina cardiaca humana. Contiene 204 aminoácidos y su extensión teórica es de 81.4 nm (0,4 nm por cada aminoácido desplegado). Al ser una proteína desplegada su señal aparecerá al principio del registro, en la zona proximal del ruido. De esta forma se consiguen alejar las señales

provenientes de la proteína de estudio (protegida mecánicamente en la proteína hospedadora) de esta zona ruidosa.

- e) Una proteína hospedadora. Este es el componente más relevante del vector. Consiste en una proteína globular que protege mecánicamente a la IDP que queremos estudiar. Las proteínas escogidas para esta función son I27 (un módulo inmunoglobulina de la titina cardiaca) o ubiquitina (Ubi). A estas proteínas hospedadoras se les introdujo un Sitio de Clonaje Múltiple (MCS, de sus siglas en inglés) en uno de los bucles de la estructura, tras el parche mecánico que mantiene plegada a la proteína. En este MCS es donde se introduciría nuestra IDP a nivel de ADN mediante técnicas de ingeniería genética. Con este diseño mecánico, es necesario desplegar primero la proteína hospedadora para que podamos acceder la señal de la proteína insertada (huésped). A esta estrategia se le llamó **estrategia hospedador-huésped o de protección mecánica**.

Mediante el uso de este vector fue posible estudiar por AFM-SMFS varias proteínas amiloides representativas: tractos de poliglutamina, α -sinucleína, $A\beta$ y el prion de levadura Sup35[37]. Todas ellas daban lugar a dos tipos de eventos:

- No-mecanoestables (NM): en este tipo de curvas la señal de la proteína desplegada aparece inmediatamente después del desplegamiento de la proteína portadora, mostrando una ΔLc correspondiente a la longitud del hospedador más la IDP: I27/Ubi+IDP. No se observa ningún pico de fuerza, lo que indica que no se ha formado ninguna estructura con una estabilidad superior a 20 pN (límite inferior de sensibilidad de fuerzas del aparato). Esto indica que en el momento de obtención del registro la proteína bajo estudio se estaba comportando como un ovillo estadístico.
- Mecanoestables (M): la IDP mostraba resistencia al estiramiento en alguna región o en su totalidad, generando uno o más picos de fuerza asociados a la rotura de una estructura intramolecular (presumiblemente estructura tipo- β , que suelen ser las más mecano-resistentes) adoptada por la proteína en ese instante. Se observó que el número de picos de fuerza, así como la magnitud de los mismos y las distancias liberadas al romperse las barreras mecánicas eran altamente variables y sus valores no seguían ninguna distribución. Dentro de estos confórmeros se definió una subclase de forma operativa:
 - o Hipermecanoestables (hM): son eventos mecanoestables cuyos picos de fuerza son iguales o superiores a los 400 pN. Este umbral fue escogido arbitrariamente, en base a que las proteínas eucariotas

previamente estudiadas suelen presentar una estabilidad inferior a este valor. Los registros con este tipo de curvas son muy poco frecuentes.

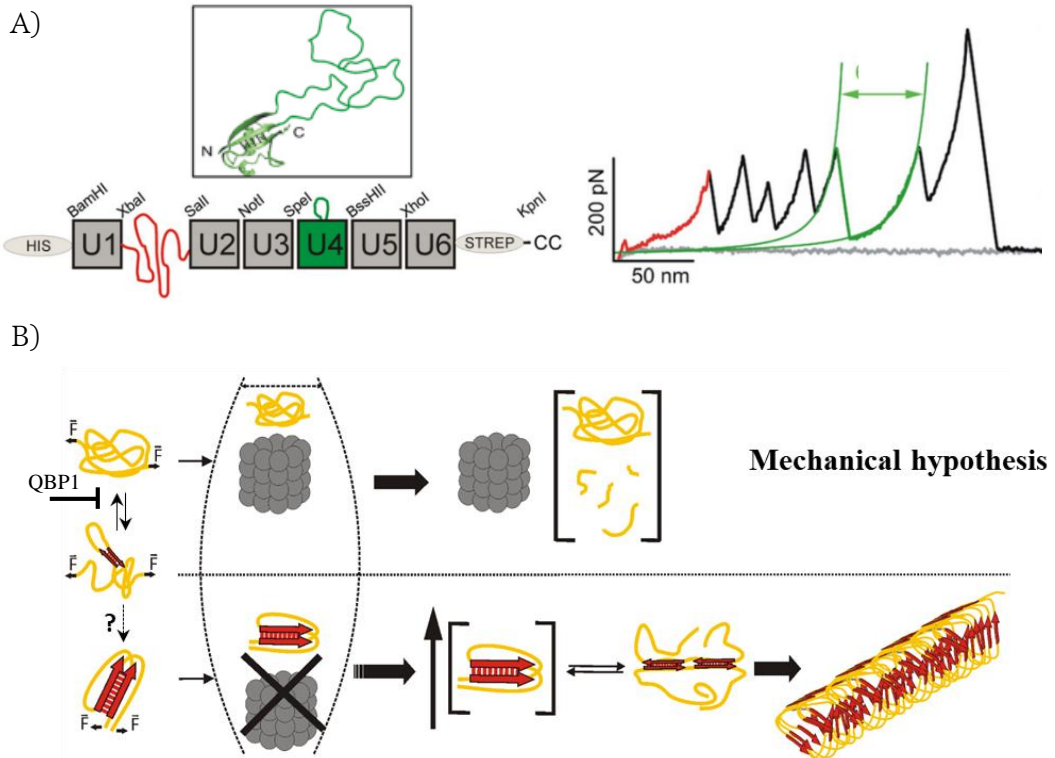


Figura 1-10. Análisis nanomecánico de proteínas amiloides. **A)** Vector pFS-2. (Izquierda) Representación esquemática de la poliproteína y la proteína de fusión hospedador-huésped. (Derecha) Espectro típico fuerza-extensión dado originado por una proteína portadora expresada por el vector pFS-2 cuando se le ha insertado una NP que se comporta como un RC[36]. **B)** Hipótesis mecánica: la causa primaria de las enfermedades neurodegenerativas amiloidogénicas podría ser el bloqueo del proteasoma por confórmers de alta mecanoestabilidad. Las NPs tienen un alto grado de polimorfismo conformacional, abarcando confórmers NM y M (que incluye el subgrupo de hM) que están en equilibrio dinámico. Sin embargo, una vez formados los hM, pueden quedar cinéticamente atrapados. Éstos bloquearían la maquinaria de procesamiento proteico de la célula, incrementando su presencia en el citosol y afectando a múltiples procesos celulares, que en última instancia acabarían con la formación de oligómeros y fibras amiloides. La formación de confórmers hM puede bloquearse con el péptido QBP1 que inhibe el cambio conformacional y desplaza el equilibrio RC/estructura- β hacia el estado RC, interrumpiendo así la cascada patológica en los primeros estadios[37].

Todas las NP del estudio presentaban un alto grado de polimorfismo conformacional a nivel de monómero, es decir, eran capaces de adoptar diferentes estructuras con distintas mecanoestabilidades. Esto quedaba exacerbado (mayor número de eventos M en general e hM, en particular) en el caso de mutantes tóxicos proagregantes.

Q-Binding Peptide-1 (QBP1) es un péptido de 11 residuos aminoacídicos que se describió originalmente como inhibidor de la agregación amiloide de poliglutaminas[38]. Se une al monómero cuando éste se encuentra como RC impidiendo su cambio conformacional a estructura- β , conformación que desencadenaría la cascada de agregación amiloide. Este péptido fue testado en todas las NP del estudio y se comprobó que era capaz de inhibir la agregación en todas ellas, a excepción del β -amiloide (*wt* y mutantes). A nivel de monómero, se observó una reducción del polimorfismo conformacional, lo que sentó las bases de la “hipótesis mecánica” como explicación del origen de la toxicidad de estas proteínas[35]. Ésta postula que la citotoxicidad estaría generada por los confórmeros hipermecanoestables que bloquearían la maquinaria de degradación proteica. Como consecuencia, la concentración de estos confórmeros aumentaría en la célula, generando su agregación amiloide y consecuente formación de fibras (**Figura 10, B**).

Parte II

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Desde el 2010 se han publicado más de 30.000 artículos relacionados con proteínas amiloides, debido al creciente interés que despiertan por su asociación a enfermedades conformacionales como EA, funciones fisiológicas como la consolidación de memoria por CPEB o incluso por su potencial uso en el campo de los biomateriales. Estas proteínas tienden a interactuar entre ellas y agregar, y este proceso ha sido ampliamente estudiado en sus últimas etapas. Sin embargo, los eventos moleculares iniciales que desencadenan el proceso son aun prácticamente desconocidos. Para conocer los determinantes moleculares que desencadenan la cascada amiloidogénica la investigación debe centrarse en el monómero; sin embargo, sólo alrededor de 100 artículos han realizado una aproximación a nivel de molécula individual, siendo las técnicas computacionales las utilizadas en la mayoría de estos estudios. Las propiedades físico-químicas y carácter dinámico de las proteínas amiloides junto con la alta especialización requerida en las técnicas de molécula individual la hacen un área muy difícil de abordar por profesionales de la biomedicina, quedando habitualmente restringido a un número reducido de expertos físicos y biofísicos.

Una de estas proteínas amiloides es tau, que actúa como principal activador del ensamblaje de microtúbulos neuronales y es fundamental en la etiopatogénesis de la EA y de muchas otras enfermedades neurodegenerativas. El tratamiento del envejecimiento cerebral es uno de los mayores retos del siglo XXI, pues sólo la EA afecta a 44 millones de personas alrededor del mundo y es la principal causa de demencia en individuos ancianos y de mediana edad. Conscientes de la repercusión de estos estudios, la presente tesis doctoral pretende abordar la elucidación del mecanismo del malplegamiento de la proteína tau y ofrecer a la comunidad científica una herramienta que haga accesible a no expertos el estudio estructural del monómero de proteínas amiloides por AFM-SMFS. A continuación, se detallan los objetivos concretos de la misma:

BLOQUE I. Bases moleculares del malplegamiento de tau.

Objetivo 1. Clonaje y expresión de las secuencias MBD *wt* y mutantes proagregantes $\Delta 280K$ y P301L de forma aislada y como proteína de fusión mecanoprottegida en el interior de la proteína portadora ubiquitina tanto aislada

como en el vector pFS-2 (para su posterior caracterización estructural/amiloidogénica y análisis nanomecánico).

Objetivo 2. Comprobación en la proteína de fusión tanto de la integridad estructural de la ubicuitina portadora como del comportamiento amiloidogénico y tóxico de las secuencias de tau insertadas.

Objetivo 3. Análisis nanomecánico mediante AFM-SMFS de las secuencias de tau.

Objetivo 4. Testar la posible inhibición amiloidogénica de tau por QBP1.

Objetivo 5. Análisis de la modulación de la nanomecánica del monómero de tau en función de los diversos factores que afectan a la agregación.

BLOQUE II. Desarrollo de una metodología para el análisis eficiente y simplificado de IDPs amiloidogénicas (aIDPs) por AFM-SMFS.

Objetivo 1. Elección de una proteína hospedadora de mayor estabilidad que la de los marcadores de monomolecularidad y su caracterización nanomecánica.

Objetivo 2. Comprobación de la integridad estructural de la proteína candidata cuando actúa como portador.

Objetivo 3. Validación de la estrategia basada en el nuevo portador mediante AFM-SMFS.

Parte III

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelado por homología y simulaciones por dinámica molecular (DM)

Los modelos estructurales del módulo de cohesina c8C de la escafoldina CipC de *Clostridium cellulolyticum* y de c8C-MCS se generaron mediante modelado por homología usando MODELLER[39]. La secuencia para c8C fue obtenida de Uniprot y el molde usado para el modelaje fue la estructura c1C (código PDB: 1G1K). Se alinearon las secuencias usando Clustal [40] y se generó un modelo para cada estructura. La calidad de los modelos fue comprobada usando el modelo Swiss para la validación de estructuras del servidor ExPASy.

Las simulaciones por DM se realizaron usando el paquete SANDER del juego de programas AMBER 10 y el set de parámetros parm-99. Las simulaciones se hicieron usando la aproximación GBSA[41-43]. El paso de tiempo empleado fue de 2 fs y el potencial electrostático se truncó en 12 Å. Para todas las estructuras, se realizaron 5000 pasos de minimización energética restringiendo la posición de los C_{α} (20 kcal/mol/Å²). A continuación, empleando un paso de tiempo de 1 fs, se aumentó la temperatura de la molécula de 0 a 300 (o 340) K con una tasa de incremento de 15 K/ps y manteniendo la misma restricción ya introducida en el proceso de minimización. Una vez que se alcanzó la temperatura deseada, las restricciones en C_{α} de la molécula se fueron retirando gradualmente durante 8 ps. A partir de este momento se realizaron simulaciones de dinámica molecular libre durante 10 ns. Seis estructuras fueron extraídas a intervalos de tiempo regulares y usadas como puntos de partida para simular el proceso de estirado. Se aplicó una restricción en la distancia de C_{α} N- y C-terminales y dicha distancia se fue aumentando de manera constante en 1 Å/ps.

Las trayectorias resultantes se analizaron mediante VDM[44]. Las curvas fuerza-extensión se calcularon a partir de las trayectorias de las simulaciones de SMD, considerando la distancia entre los C_{α} de los extremos N- y C-terminales. Los valores de fuerza se calcularon en base a la ecuación $F = -k (X_{N-Ct} - X_{N-C0} - t \cdot v)$, donde k es la constante de la restricción empleada en las simulaciones (5 kcal/mol/Å²), X_{N-Ct} es la distancia entre los C_{α} en el instante t , X_{N-C0} es la distancia entre los C_{α} al iniciar el estirado y v es la velocidad de estiramiento. El valor de la fluctuación cuadrática media

(RMSF, de sus siglas en inglés) de los C α fue calculado a partir de los últimos 2 ns de la trayectoria en la SMD estudiada.

Clonaje molecular

La secuencia codificante de la región citoplasmática (residuos 1-94) de VAMP2 *de Rattus norvegicus* (código P63045 de UniProt/SwissProt) y la que comprende las cuatro repeticiones de la proteína tau (MBD), fueron amplificadas por PCR mediante la ADN polimerasa *Phusion HighFidelity* (Finnzymes). Como moldes se usaron el plásmido que contiene la secuencia completa de VAMP2 (PpGEX-KGVAMP2[45]) y un vector pSG5 cedido por el Prof. Jesús Ávila (CBMSO-UAM) donde estaba clonada la secuencia completa de la isoforma humana de tau más extensa (hTau42), respectivamente. La región codificante de c8C fue amplificada a partir de ADN genómico previamente purificado de cultivos liofilizados de *C. cellulolyticum* [ATCC 35319[46]]. Antes de su subclonaje en los vectores de expresión finales, en todos los casos se hizo un paso intermedio de clonaje utilizando los vectores pCR2.1 (Invitrogen) o pT7Blue (Novagen).

Para generar la poliproteína pAFM-c8C, la secuencia del módulo de cohesina fue clonada en el vector pAFM *via* KpnI-SpeI[47]. A continuación, el módulo c8C fue modificado mediante la inserción de un MCS en un bucle natural tolerante de la proteína. El orden de los lugares de restricción del MCS, comenzando por el N-terminal es AgeI, BsiWI, SmaI y MluI, que codifican para los residuos aminoacídicos TG, RS, PG y TR, respectivamente. Además, se incluyó un espaciador entre los sitios de restricción para mejorar la digestión enzimática (TCATCA, que codifica para SS) y dos residuos de glicina en cada extremo del MCS, para hacer a esta región más flexible. La secuencia completa del MCS es **GGTGGAAACCGGTCGTACGTCATCACCCGGGACGCGTGGAGGA** (los nucleótidos que contienen los lugares de restricción aparecen marcados en negrita). Esta inserción se llevó a cabo en dos pasos consecutivos (**Tabla 1**); primero, se introdujo la secuencia gcagcatcaacgcaacaggtgga**accggctcgtacg**tcaactggtacaatcagatcc, y tras una segunda adición, la secuencia resultante fue gga**accggctcgtacg**tcatc**accgggacgctg**ggaggaaactggtacaatcagatcc. Finalmente, se clonó la proteína portadora c8C-MCS en el pFS-2 mediante las enzimas SpeI-BssHII[36] y en el pAFM mediante NheI-XbaI. En la versión de pFS-2 se eliminó la secuencia N2B, ya que por una parte su función es prescindible en la nueva estrategia y además se previene así de posibles interacciones no deseadas entre este fragmento desordenado

y la IDP bajo estudio. Para ello, el vector original pFS-2 se digirió con XbaI-SalI para escindir este fragmento e introducir una repetición adicional de ubiquitina.

Para los clonajes en el vector pET28a, se incluyeron en los cebadores los lugares de restricción Nhe-Xho. Para la inserción en las proteínas hospedadoras (ubiquitina-MCS y c8C-MCS), se escogieron las dianas Age-SalI en el caso de Vamp2 y AgeI-MluI en el caso de MBD. La generación de los mutantes Δ 280K y P301L se realizó mediante mutagénesis dirigida usando el *kit Phusion High Fidelity PCR*, y la inserción del MCS en el módulo c8C se realizó en dos pasos de clonaje (**Tabla 1**). Tras secuenciar las proteínas insertadas, éstas fueron digeridas y ligadas en sus vectores finales, y posteriormente transformados en la cepa XL1Blue de *E. coli* (Stratagene).

Los cebadores utilizados fueron los siguientes:

Tabla 1. Cebadores utilizados para el clonaje de las proteínas huésped, inserción de mutaciones puntuales y generación del MCS en el módulo c8C de la escafoldinga de *C. cellulolyticum*. Los sitios de restricción introducidos por PCR en las secuencias amplificadas se señalan en gris, negrita y cursiva, mientras que las mutaciones y secuencias adicionales añadidas se marcan en cursiva y negrita. En el caso del MCS, las inserciones aparecen en mayúsculas y las dianas en gris, negrita y cursiva. Las secuencias añadidas en cada sitio de restricción, fueron escogidas según las recomendaciones de New England Biolabs, con el fin de optimizar la reacción enzimática. Todos los cebadores fueron adquiridos de *Sigma-Aldrich*.

cebadores	Secuencia 5' → 3'
5' <i>AgeI</i> _VAMP2	CAA ACCGGT ATGTCCGGCTACCGCTGCCACCG
3' <i>SalI</i> _VAMP2	TCC CCCGGG CCTTGAGGTTTTTCCACCAG
5' <i>AgeI</i> _MBD	CAA ACCGGT CTGCAGACAGCCCCCGTGC
3' <i>MluI</i> _MBD	CAA ACCGGT ATTTTCCTCCGCCAGGGACG
5' <i>NheI</i> _MBD	CA AGCTAG CCTGCAGACAGCCCCCGTGC
3' <i>XhoI</i> _MBD	CAA CTCGAG ATTTTCCTCCGCCAGGGACG
5' Δ 280K_MBD	GGTGCAGATAATTAAT (Δ)AAGCTGGATCTTAGCAACGTCC
3' Δ 280K_MBD	GGACGTTGCTAAGATCCAGCTT (Δ)ATTAATTATCTGCACC
5' P301L_MBD	GGATAATATCAAACACGTCC TGGGAGGCGGCAGTGTGC
3' P301L_MBD	GCACACTGCCGCCTCCC AGGACGTGTTTGATATTATCC
5' Inserción MCS 1	gcagcatcaacgcaacaGGT GGAACCGGT CGTACGTCA actggtacaatc agtatcc
3' Inserción MCS 1	ggatactgattgtaccagtTG ACGTACGACCGGT TCCACctggtgcggtg atgctgc
5' Inserción MCS 2	ggaaccgggtcgtacgtcaTCA CCCGGGACGCGT GGAGGAactggtacaat cagtatcc
3' Inserción MCS 2	ggatactgattgtaccagtTCTCC ACGCGTCCCGGGT GA tgacgtacga cgggttcc

Expresión y purificación de proteínas

Las construcciones resultantes se transformaron en células competentes de las cepas de expresión c41 y BL21 de *E. coli*, para hacer una expresión piloto (a pequeña escala, analítica). La selección del clon de interés se realizó mediante tinción por *azul de Coomassie* en geles de poliacrilamida y/o *Western Blotting*, para detectar la cepa que produce una mayor expresión. Esta última técnica es útil en el caso de encontrarnos con una baja expresión proteica (como suele ocurrir con las poliproteínas), o para detectar degradación, algo muy frecuente en la expresión de proteínas neurotóxicas, y/o agregación.

En la producción a gran escala, los cultivos de los clones seleccionados se incubaron a 37°C y con una agitación de 280-300 rpm hasta alcanzar una OD_{595nm} de 0,4-1. A continuación, se induce la expresión de la proteína recombinante durante 3-4 horas mediante la adición de 1 mM de IPTG.

La lisis de las células resultantes se realizó mediante lisozima, detergente Tween-20 y pulsos de sonicación, como se describe en la bibliografía[37]. La purificación se llevó a cabo en un aparato FPLC (ÄKTA Purifier, GE Healthcare). Debido a que nuestras proteínas recombinantes tienen una cola de histidinas en el N-terminal, se comenzó con una cromatografía de afinidad por Ni²⁺, empleando columnas *Histrap HP* (GE Healthcare), que se continuó con una cromatografía de exclusión molecular, usando una columna *HiLoad 16/60 200 PG* (GE Healthcare). La concentración de proteína fue determinada por la absorbancia a 280 nm, usando su tamaño molecular y su coeficiente de extinción molar obtenido en <http://www.protparam.com>. El tampón de carga usado para la afinidad fue 50mM Na₃PO₄/500 mM NaCl/50 mM imidazol, pH 7,4; la misma composición presentaba el tampón de elución, además de imidazol a 500 mM; mientras que para la exclusión molecular se utilizó Tris 10 mM o PBS, ambos a pH 7,4. Los tampones usados en la purificación de las proteínas de fusión y de hetero-poliproteínas (vectores para el análisis por AFM-SMFS con MBD como huésped), contenían 1,5 M de cloruro de guanidinio. Esta concentración no desnaturaliza la ubicuitina[48] y sin embargo por una parte evita la formación de interacciones inespecíficas de la aIDP con otras proteínas (eliminando así contaminantes) y por otra dificulta la agregación durante el proceso de purificación. La concentración de cloruro de guanidinio se incrementó a 3 M para la purificación de las variantes de MBD aisladas.

Los cambios de tampones se hicieron mediante ultrafiltración utilizando filtros Amicon. El péptido QBP1-M8 (*core* de 8 residuos) acetilado en el grupo amino del N-terminal fue sintetizado en el Servicio de Proteómica del CBMO/UAM-CSIC mediante

síntesis química en fase sólida Fmoc, y disuelto en dimetilsulfóxido. Éste péptido fue añadido a las muestras en relación molar 10:1, 20 minutos antes del inicio de los experimentos.

Calorimetría diferencial de barrido

Las proteínas se utilizaron a una concentración de 50 μM en 10 mM de glicina/ácido acético, pH 3,0. Las medidas se realizaron en un microcalorímetro VP-DSC (MicroCal, LLC) a 222 nm, y los datos fueron analizados con el software DSC-Origin. Para las muestras con la ubicuitina portadora, se realizó un barrido de temperatura desde 10°C a 115°C, a una velocidad de calentamiento de 50°C/h, mientras que para las muestras con c8C fue a 60°C/h.

Dicroísmo circular (CD)

Las muestras para las medidas en el espectro del ultravioleta lejano por dicroísmo circular (CD, de sus siglas en inglés) se encontraban a unas concentraciones de 5-20 μM . Las medidas se hicieron a 25°C, el tampón usado fue KH_2PO_4 a pH 7,0 y se empleó un espectropolarímetro JASCO-J810 (JASCO Inc.) equipado con una unidad de control de temperatura *Peltier*, con el uso de cubetas de cuarzo de 1 mm de paso de luz[37]. Las muestras de MBD, la ubicuitina portadora de fusión y la poliproteína de fusión, se incubaron a 37°C sin agitación, en presencia de 0,02% NaN_3 , que se empleó como agente bacteriostático. Se tomaron medidas en los días 0, 2, 5 y 7 y se sustrajo la contribución del tampón. Los espectros fueron convertidos a elipticidad molar a través del software Spectra Manager (Jasco Inc.), usando el promedio de masa molecular por residuo. El contenido de estructura secundaria de cada proteína y su evolución en el tiempo, se estimó por deconvolución de espectros, utilizando el programa de análisis CDNN[49]. Para calcular el contenido de estructura secundaria del MBD en la proteína de fusión, se sustrajo la contribución de la señal del módulo portador. Para las medidas de estabilidad térmica, los cambios de elipticidad inducidos por el incremento de temperatura fueron medidos a 222 nm a una ratio de calentamiento constante de 60°C/h, encontrándose las muestras a una concentración de 20 μM . Los cambios de energía libre en el desplegamiento de las proteínas fueron calculados a partir de las curvas de desnaturalización térmica. Para ello, se tuvo en cuenta el cambio en la capacidad calorífica, ΔC_p , de cada proteína asociado a su desplegamiento[50].

Resonancia magnética nuclear (NMR)

Las muestras para los experimentos de resonancia magnética nuclear (NMR, de sus siglas en inglés) monodimensional tenían una concentración aproximada de 0,2 mM mientras que las ^1H 2D NOESY estaban en torno a 1 mM, todas ellas en un tampón KH_2PO_4 a pH 4,7, al 10% de D_2O . Las medidas se realizaron a 25°C, usando un espectrómetro Bruker AV 800 (*Bruker BioSpin*) equipado con criosonda y gradientes de campo en z. La temperatura se calibró usando una muestra de metanol y la señal del grupo trimetilo del 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato (DSS) se utilizó como referencia interna de desplazamiento químico. Con el fin de reducir la señal de agua presente en la muestra, se realizó una pre-saturación selectiva o módulo WATERGATE[51]. El tiempo de mezcla para los experimentos ^1H 2D NOESY fue de 100 ms. Finalmente, los espectros fueron analizados con el software TopSpin 2.0 (*Bruker BioSpin*).

Immunodot blot

Las proteínas recombinantes fueron incubadas a 37 °C sin agitación en PBS (pH 7,0). A los siete días, se cogieron 2 μl de cada muestra y se depositaron sobre una membrana de nitrocelulosa. Tras una hora de bloqueo a temperatura ambiente (RT, del inglés *room temperature*) en un tampón que contenía leche desnatada al 10% en TBS y 0,01% de Tween 20 (TBS-T), se incubó la membrana durante una hora a RT con los anticuerpos policlonales A11 (Life Technologies) y OC (Millipore), diluidos 1:1000 en 3% BSA TBS-T. Se hicieron 3 lavados de 5 minutos cada uno con TBS-T, antes de ser incubadas otra hora con el anticuerpo secundario anti-rabbit conjugado con peroxidasa (GE Healthcare) a una dilución 1:5000 en 3% BSA/TBS-T a RT. Posteriormente, se realizaron otros 3 lavados de 5 minutos en tampón TBS-T, y las membranas finalmente se revelaron con el juego quimioluminiscente de revelado ECL Plus de Amersham-Pharmacia (GE Healthcare). Los oligómeros prefibrilares y especies fibrilares de $\text{A}\beta_{42}$ se usaron como controles positivos para la reactividad de A11 y OC, respectivamente.

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las muestras de tau y Ubi-tau se incubaron en ausencia y presencia de QBP1 durante 30 días a 37 °C sin agitación, a una concentración de 40 μM en PBS a pH 7,4, 5mM DTT y presencia de 0,02% de NaN_3 . 10 μl de cada muestra se adsorbieron durante 3 minutos en rejillas de cobre y reticuladas de malla 300 recubiertas con carbono (Ted Pella), previamente ionizadas mediante su exposición a una lámpara UV durante 10

minutos (UV/Ozono ProCleaner™ Plus, *Bioforce Nanoscience Inc.*) La muestra se tiñó negativamente incubando la rejilla en 2 μ l de acetato de uranilo al 1%. Finalmente, las rejillas se limpiaron por inmersión en agua MilliQ y se secaron mediante evaporación a RT.

Microinyección de proteínas en células individuales.

La línea celular COS-7 se cultivó y mantuvo en DMEM suplementado con 10% (v/v) de suero fetal de ternera, FBS (Life Technologies). El día previo a las microinyecciones, se pasaron las células a placas de 35 mm² hasta alcanzar una densidad de $1 \cdot 10^5$ células/placa. Con la ayuda de un micromanipulador (Narishige), las muestras se microinyectaron utilizando un protocolo de doble ciego en el citoplasma de células individuales (n=100-200 células por muestra, 3 repeticiones por muestra), junto con dextrano marcado con fluoresceína (10,000 MW, Life Technologies). Las imágenes de microscopía de fluorescencia se adquirieron con una cámara CCD modelo C4742-95-12ER (Hamamatsu Photonics). Ubiquitina, Ubi-MCS y Vamp2Cyt se microinyectaron como controles negativos. Usando un microscopio de fluorescencia IX70 (Olympus), la viabilidad celular se monitorizó con el conteo del número de células fluoresceína positivas que mantenían una morfología sana (mantenimiento de la forma alargada, ausencia de gránulos alrededor del núcleo, ausencia de vacuolización citoplasmática, etc.) tres horas después de la microinyección. A este valor se le asignó como 100% de la viabilidad celular. El conteo celular se llevó a cabo cada 24 horas durante 3 días. Los datos de viabilidad se presentan como media \pm EEM; las curvas de supervivencia en el tiempo y ratios de supervivencia a las 24 horas, respectivamente, se analizaron mediante una ANOVA de dos factores y posterior test de Bonferroni y ANOVA de una vía y test post-hoc de Tukey. Los análisis estadísticos se realizaron mediante GraphPad Prism 5 (GraphPad Software).

Turbidimetría y unión a Rojo Congo

Las muestras se encontraban a una concentración de 20 μ M en PBS pH 7,4 y 5 mM de DTT, en ausencia o presencia de 100 μ M de QBP1. Se hicieron 3 medidas de turbidez a 405 nm con cada muestra y para la medición de la unión del Rojo Congo (CR, de sus siglas en inglés), 30 minutos antes se añadieron 20 μ M del colorante. La concentración de RC unido al amiloide formado se determinó usando la siguiente ecuación: Rojo Congo unido (μ mol/l) = $A_{540}/25,295 - A_{480}/46,306$ [52].

Nota: cada día se añadió 1 mM de DTT a las muestras incubadas a 37 °C que posteriormente se utilizarían en los ensayos de CD, TEM, unión a CR y turbidimetría. Así se consigue evitar la formación del enlace disulfuro entre las cisteínas C291 y C322 que originan un “monómero compacto” que impide la fibrilación[53].

AFM-SMFS

Cubreobjetos funcionalizados con NTA-Ni²⁺

La cola de histidinas (His-tag) de los vectores usados en los experimentos de AFM-SMFS (basados en pFS-2 y pAFM) además de utilizarse para la purificación por afinidad de la proteína, pueden usarse también como estrategia de anclaje al sustrato. Para ello, se funcionalizaron cristales TED PELLA sumergiéndolos en una solución 1:1 de MeOH (100%) y HCl (37%). Tras su lavado con agua MilliQ, se sumergieron en tolueno. Posteriormente, se sumergieron en una solución al 5% de 3-mercaptopropiltrimetoxisilano en tolueno y se incubaron durante 4 horas con una agitación de 30 rpm. Tras la retirada de la solución y posterior lavado con tolueno, se hizo un lavado adicional con etanol. Una vez secos, se incubaron en un horno a 120°C durante la noche. Tras dejarlos enfriar, se añadió 100 mM DTT disuelto en una solución de TrisHCl a 50 mM. Se incubó durante 15 minutos y se hicieron varios lavados con agua. A continuación, se depositó 20 µl de una solución a 20 mg/ml de maleimida-C3-NTA (*Dojindo Molecular Technologies*) disuelta en 10 mM de ácido-(N-morfolino) propanosulfónico a pH 7,0 en el centro de cada cubreobjetos. Tras su incubación durante 30 minutos, lavado y secado, se depositó en el centro del cristal 30 µl de 50 mM NiCl₂ durante 10 minutos. Finalmente, los cubreobjetos se lavaron en agua milliQ antes de su almacenamiento a temperatura ambiente.

Experimentos de AFM-SMFS

Las medidas de SMFS se llevaron a cabo en una versión modificada de un AFM casero[54, 55] y en un AFS (Luigs & Neumann), usando 2-10 µM de poliproteína en TrisHCl 10 mM a pH 7,0 que se almacenaba a 4 °C entre sesiones de experimentos. Por otra parte, para el análisis de MBD, se utilizaron un tampón que denominamos “proamiloidogénico” y otro “antiamiloidogénico”. El primero está compuesto por TrisHCl a pH 10, con heparina añadida en el comienzo del experimento a una relación 3:1 respecto a MBD. El segundo consiste en una solución con mayor fuerza iónica, compuesto por PBS a pH 7,0.

Se colocaron 2-8 μl de proteína purificada sobre 10 μl del tampón experimental, previamente filtrado y colocado sobre el cubreobjetos funcionalizado. Se incubó durante 15 minutos para permitir que la proteína se uniese a la superficie funcionalizada con Ni^{2+} . Para cada experimento, el cantiléver fue sometido a 5 minutos de radiación ultravioleta en un aparato UV/Ozono ProCleaner™ Plus (Bioforce Nanoscience Inc.) y la constante de muelle de cada micropalanca individual (MLCT-AUNM, Veeco Metrology Group; and Biolever, Olympus) fue determinada mediante la aplicación del teorema de equipartición[56] al espectro de potencias. Todos los experimentos de SMFS se realizaron a una velocidad de estiramiento constante de 0,4 nm/ms.

Los datos fueron analizados mediante el software Igor Pro 6 (Wavemetrics) usando el modelo WLC de elasticidad de polímeros[57]:

$$F(x) = \frac{k_B T}{p} \left[\frac{1}{4 \left(1 - \frac{x}{L_c}\right)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_c} \right]$$

donde F es la fuerza externa de estiramiento, p corresponde con la longitud de persistencia, x es la longitud entre extremos y L_c es la longitud de contorno de la proteína estirada. L_c y p son los parámetros ajustables de la ecuación. Los datos de las distribuciones vienen dados como media \pm desviación estándar.

Para asegurarnos de que los registros fuerza-extensión escogidos para el análisis corresponden al estiramiento de una sola molécula de proteína, los criterios establecidos para la selección de los mismos fueron los siguientes:

Cuando se emplea el vector pFS-2,

- i) Debemos encontrar un **patrón de picos en diente de sierra**, correspondientes al desplegamiento de los marcadores de monomolecularidad (repeticiones de ubicuitina)[58]. No establecemos un número mínimo de marcadores, pues no es necesario.
- ii) La señal obtenida por el desplegamiento del **módulo portador** debe **preceder** siempre a la proveniente de nuestra **proteína bajo estudio**, ya que MBD (en ese caso) se encuentra protegida mecánicamente por la ubicuitina hospedadora. Sin embargo, ambas señales pueden aparecer o no contiguas.
- iii) A no ser que el registro carezca completamente de ruido, la **señal** de nuestra proteína de interés debe aparecer **posterior** a los primeros **50-70 nm del registro**. En esta zona predominan las interacciones inespecíficas[59], por lo

que no podemos estar seguros de que los picos de fuerza que aparecen en esta región correspondan a señales monomoleculares. Para evitarlo, el vector consta de un fragmento desordenado, el péptido N2B de titina cardíaca humana, que actúa como espaciador alejando nuestra señal de la zona ruidosa. Las repeticiones de ubicuitina también cumplen esta otra función.

- iv) Tras la ruptura del módulo portador, las longitudes de las señales que no pueden ser asignadas como ubicuitinas deben **sumar la longitud correspondiente a nuestra MBD desplegada** (0,4 nm por residuo aminoácido[35]). Longitudes menores o mayores serán descartadas.

Cuando se emplea la estrategia c8C, además de cumplir los requisitos anteriores, se añaden dos criterios adicionales:

- v) El **hospedador** (c8C) debe ser claramente **identificable por su mayor mecanoestabilidad** en comparación con los marcadores de monomolecularidad (ubicuitinas/I27).
- vi) Las señales del hospedador y de la proteína insertada deben aparecer **unificadas** y a continuación del patrón de dientes de sierra, al **final del registro**.

Análisis estadístico: test chi-cuadrado

Para analizar si las frecuencias de población NM/M variaban significativamente en función de una condición, utilizamos el test de independencia chi-cuadrado (χ^2). Este test mide la dependencia entre dos variables cualitativas. Así determinamos si las variables independientes “QBP1”, “tampón” o “mutaciones” alteran el grado de estructuración de la muestra; es decir, si tienen un efecto sobre la variable dependiente “Formación de Estructuras”, que puede tomar valores NM/M.

En la Hipótesis Nula (H_0), las variables independientes no están relacionadas con la “Formación de Estructuras”, mientras que, en la Hipótesis Alternativa, sí. Esto se estima calculando la probabilidad de que una muestra provenga de una población con proporciones esperadas en cada categoría. Sin embargo, en nuestro caso, no tenemos una hipótesis preconcebida acerca de las proporciones esperadas, sino que simplemente queremos comparar las muestras entre ellas. En la hipótesis nula, las proporciones entre muestras deben ser iguales, por lo que esta **frecuencia esperada** debe calcularse. Para ello, se genera una **tabla de contingencia** donde se calculan **los totales marginales**, que son los números totales en las filas y en las columnas. Los totales marginales de las columnas y las filas se multiplican entre sí, y se dividen entre

el total de eventos. El estadístico χ^2 es la suma de cada frecuencia observada menos su frecuencia esperada, al cuadrado y dividida por la frecuencia esperada:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(o_i - e_i)^2}{e_i}$$

Si hay una perfecta concordancia entre cada frecuencia observada y la esperada, el valor de chi-cuadrado será cero. El 5% de las desviaciones más aisladas de la ratio esperada ($p = 0,05$) se consideran estadísticamente significativas y excederán el valor crítico de chi-cuadrado. Los valores de χ^2 aparecen en la siguiente tabla:

DISTRIBUCION DE χ^2

Grados de libertad	Probabilidad											
	0,95	0,90	0,80	0,70	0,50	0,30	0,20	0,10	0,05	0,01	0,001	
1	0,004	0,02	0,06	0,15	0,46	1,07	1,64	2,71	3,84	6,64	10,83	
2	0,10	0,21	0,45	0,71	1,39	2,41	3,22	4,60	5,99	9,21	13,82	
3	0,35	0,58	1,01	1,42	2,37	3,66	4,64	6,25	7,82	11,34	16,27	
4	0,71	1,06	1,65	2,20	3,36	4,88	5,99	7,78	9,49	13,28	18,47	
5	1,14	1,61	2,34	3,00	4,35	6,06	7,29	9,24	11,07	15,09	20,52	
6	1,63	2,20	3,07	3,83	5,35	7,23	8,56	10,64	12,59	16,81	22,46	
7	2,17	2,83	3,82	4,67	6,35	8,38	9,80	12,02	14,07	18,48	24,32	
8	2,73	3,49	4,59	5,53	7,34	9,52	11,03	13,36	15,51	20,09	26,12	
9	3,32	4,17	5,38	6,39	8,34	10,66	12,24	14,68	16,92	21,67	27,88	
10	3,94	4,86	6,18	7,27	9,34	11,78	13,44	15,99	18,31	23,21	29,59	
	No significativo								Significativo			

El número de **grados de libertad** para cada análisis se calcula como el número de columnas de la tabla de contingencia menos uno, multiplicado por el número de filas menos uno. Así, el valor crítico 5% para chi-cuadrado con dos grados de libertad, usados en los análisis de dependencia de las variables “tampón” y “mutaciones” es 5,99. Cuando sólo hay un grado de libertad y el tamaño muestral total es menor de 200, se debe aplicar la **corrección de Yates** o también llamada **corrección por continuidad**, que elimina 0,5 de la diferencia absoluta entre la frecuencia observada y la esperada.

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(|o_i - e_i| - 0,5)^2}{e_i}$$

Fue diseñada para mejorar la precisión del estadístico chi-cuadrado para muestras pequeñas con un grado de libertad. Por tanto, éste fue aplicado en el análisis del efecto de QBP1 en el monómero de tau.

Parte IV

RESULTADOS

RESULTADOS

BLOQUE I

COMPORTAMIENTO DEL MONOMERO DE TAU: SIMILITUDES Y DIFERENCIAS CON OTRAS PROTEÍNAS NEUROTÓXICAS

NANOMECAÁNICA DE TAU

Validación de la estrategia

- Integridad estructural de la proteína portadora (*per se* y con inserto): estabilidad térmica

Uno de los **requisitos para llevar a cabo el análisis por SMFS** de una IDP mediante la estrategia de la protección mecánica, es que la proteína portadora mantenga su integridad estructural tras la inserción de la proteína huésped. Mediante estudios experimentales y teóricos se ha demostrado que la inserción de un bucle largo en una proteína puede producir una desestabilización en su plegamiento, y que este efecto desestabilizador va a depender del tamaño, del tipo de residuos añadidos y de la estructura adoptada por la secuencia insertada[60]. Así que, el primer paso para comenzar con la validación de nuestra estrategia, es estudiar el posible cambio en la estabilidad termodinámica que puede causar la inserción de nuestra proteína bajo estudio. Se cuantificó la **termoestabilidad** en el caso de la inserción del MCS y cuando la ubicuitina portadora albergaba tau (**Figura 4(I)-1**). En principio, los parámetros termodinámicos ΔH_{cal} , $\Delta H_{Vant\ Hoff}$ y $\Delta S_{Vant\ Hoff}$ se podrían calcular mediante la integración de la curva de desnaturalización y tras un análisis de Vant Hoff. Sin embargo, consideramos que no aportan información crítica para una mayor comprensión del sistema, por lo que se optó por no hacer esos cálculos. En todo caso, el parámetro ΔC_p sería difícil de obtener a partir de los datos obtenidos, debido a la pequeña diferencia entre las líneas base pre- y post-transición.

Se comprobó un descenso progresivo de la termoestabilidad con cada inserción, aunque los valores de T_m seguían siendo suficientemente altos como para poder llevar a cabo los experimentos por SMFS, realizados a temperatura ambiente. Se debe aclarar que en cualquier caso, la termoestabilidad no correlaciona con la mecanoestabilidad y por tanto no permite predecirla ni siquiera de forma cualitativa[61]. Por tanto, la termoestabilidad sería una condición necesaria pero no suficiente para poder emplear la estrategia de protección mecánica.

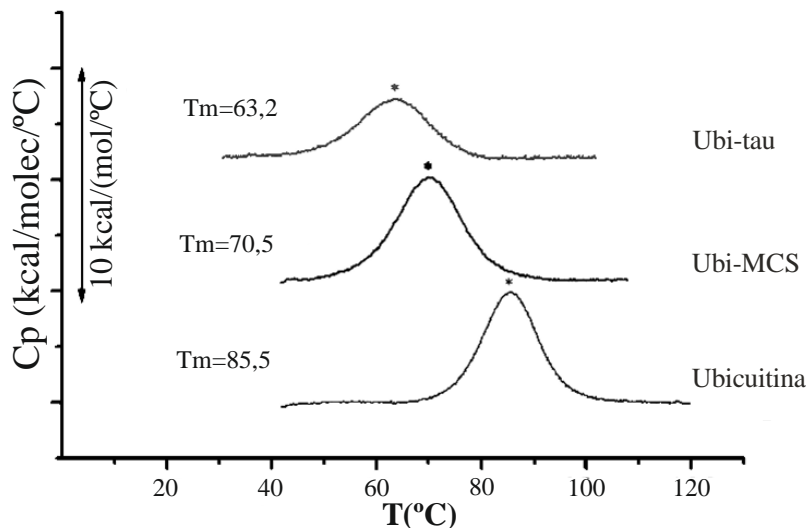


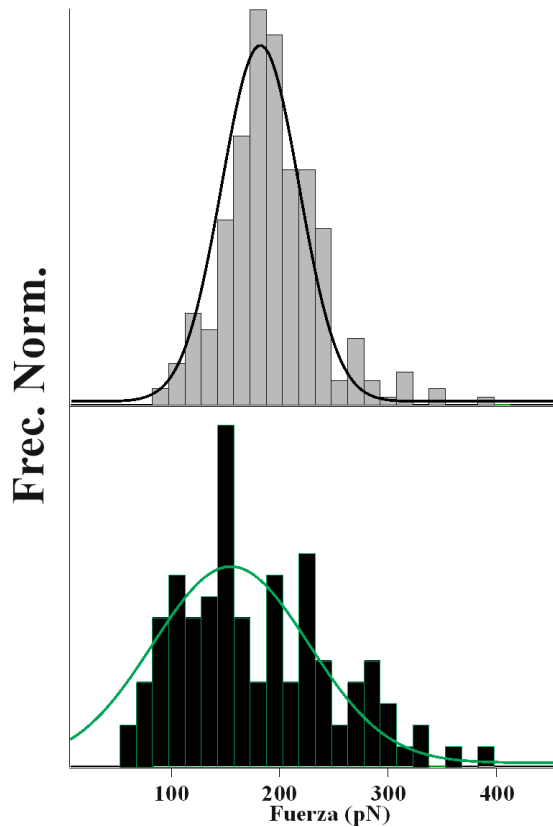
Figura 4(I)-1. Efecto de la inserción de tau en la estabilidad termodinámica de la ubiquitina portadora. Las curvas de calorimetría diferencial de barrido muestran la estabilidad termodinámica de la ubiquitina y cómo ésta va disminuyendo a medida que se realizan las inserciones necesarias para que actúe como portadora.

- Integridad mecánica de la proteína portadora (*per se* y con inserto): mecanoestabilidad.

Para cuantificar la mecanoestabilidad de nuestra proteína portadora, y descartar una posible desestabilización mecánica que desaconsejase su uso como protector mecánico de tau, se analizó la distribución de F_u generada al albergar MBD. Para ello, se realizaron experimentos de SMFS usando el vector pFS-2 con nuestra IDP. Tras la selección de registros siguiendo los criterios detallados en **Materiales y Métodos**, se analizaron los valores de desplegamiento de 282 módulos marcadores de monomolecularidad y 112 módulos portadores.

De forma similar a los resultados publicados [37], se observa una desestabilización de la ubiquitina al actuar como protector mecánico que alberga una IDP (**Figura 4(I)-2**). Concretamente, su F_u promedio desciende de 182 pN a 157 pN, observándose también una mayor dispersión de los valores. Concluimos, por tanto, que tau desestabiliza la mecanoestabilidad de la ubiquitina. Sin embargo, este descenso de la estabilidad es bastante moderado, algo que no desaconseja su utilización.

Figura 4(I)-2. Distribuciones de F_u generadas por ubicuitinas marcadoras de monomoleculalidad y cuando actúan como portadoras. Panel superior) Tras el análisis de 282 módulos marcadores se obtiene una fuerza de desplegamiento de 182 ± 50 pN. **Panel inferior)** La estabilidad de 112 módulos portadores muestran un descenso y mayor dispersión de la estabilidad mecánica de la ubicuitina al albergar tau, originando una $F_u = 157 \pm 104$ pN.



- Integridad estructural de la proteína huésped (*per se* e integrada en la proteína portadora) y descarte de interacciones espurias

Para que los datos recogidos de nuestra proteína sean válidos, también debemos asegurarnos de que sus características estructurales no han cambiado tras la inserción. Además, debemos considerar que el hecho de fusionar dos proteínas podría provocar una interacción entre ellas. Si esto ocurriese, el uso del vector pFS-2 debería ser descartado, pues los picos de fuerza detectados por SMFS podrían ser originados total o parcialmente por la ruptura de estas **interacciones espurias** y no necesariamente por las interacciones intramoleculares de nuestra proteína bajo estudio. De esta manera, se obtendrían datos contaminados que podrían desembocar en conclusiones equivocadas.

Por todo esto, se realizaron en primer lugar medidas de **Dicroísmo Circular** en el UV lejano para caracterizar globalmente el contenido en estructura secundaria de la proteína de fusión recombinante (**Figura 4(I)-3**). Las medidas se hicieron sobre la proteína huésped MBD, la proteína hospedadora ubicuitina-MCS y la proteína obtenida tras la fusión de ambas. El espectro de ubicuitina-MCS se corresponde con el publicado para la ubicuitina[62] y resulta característico de proteínas con contenido

α/β . Por otro lado, el espectro de tau es idéntico a los ya publicados[30], con un marcado mínimo a 200 nm característico de las proteínas en ovillo estadístico. Por último, Ubi-Tau presenta un patrón intermedio entre los dos anteriores, apreciándose la contribución tanto de la proteína plegada como de la desplegada. Este espectro sería un promedio teórico de los espectros anteriores, indicando que ambas proteínas continúan manteniendo su conformación nativa.

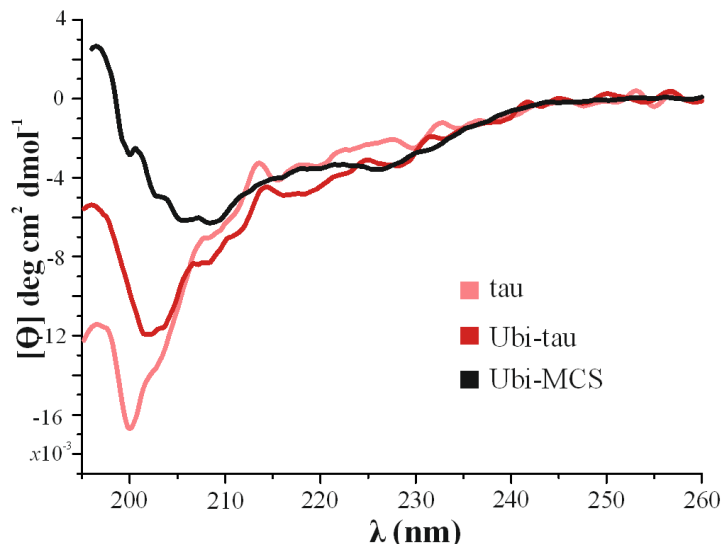


Figura 4(I)-3.
Conformación global de las proteínas hospedadora, huésped y de fusión.
 Superposición de los espectros obtenidos por CD. Tanto el espectro de la ubiquitina-MCS como el de Tau, se corresponden con aquellos publicados para ambas proteínas, mientras que la proteína de fusión muestra un patrón intermedio entre ambos.

Para resolver a nivel de aminoácido la estructura de la proteína de fusión y testar si existe interacción entre tau y ubiquitina-MCS en las proteínas híbridas se llevaron a cabo experimentos de NMR monodimensional de ^1H (**Figura 4(I)-4**) (técnica estructural de alta resolución). El espectro de ubiquitina-MCS muestra un patrón típico de proteína plegada, con picos muy definidos en la zona ~ 8 ppm y en valores menores de 0,6 ppm (que son zonas típicas de los NH de los aminoácidos y de los H de los grupos alifáticos que se encuentran situados sobre anillos aromáticos en el núcleo hidrófobo de la proteína, respectivamente). Por su parte, el espectro de MBD es consistente con una proteína con comportamiento de ovillo estadístico, pues no muestra señales en la región $<0,6$ ppm y muestra poca dispersión en la zona de señales de NH (~ 8 ppm). Los espectros de tau y Ubi-tau son bastante similares, con cambios muy sutiles encontrados mayormente en las regiones $<0,6$ ppm y ~ 8 ppm. Esto se debe a la mayor proporción de residuos desestructurados que estructurados (76 residuos de la ubiquitina vs. 126 de tau-MBD) en la proteína portador-huésped. Dado que el desplazamiento químico es especialmente sensible a la conformación local, podemos concluir que el núcleo de ubiquitina mantiene su conformación, y que dicha conformación y empaquetamiento de grupos hidrofóbicos son esencialmente idénticos

en el monómero de ubiquitina aislado y en la proteína de fusión con tau. Los picos de la ubiquitina en Ubi-tau aparecen ensanchados debido a que la rotación global de la ubiquitina en la proteína híbrida es más lenta que en el monómero (dado que su masa es mayor) y los residuos asignados se corresponden con los publicados previamente[63].

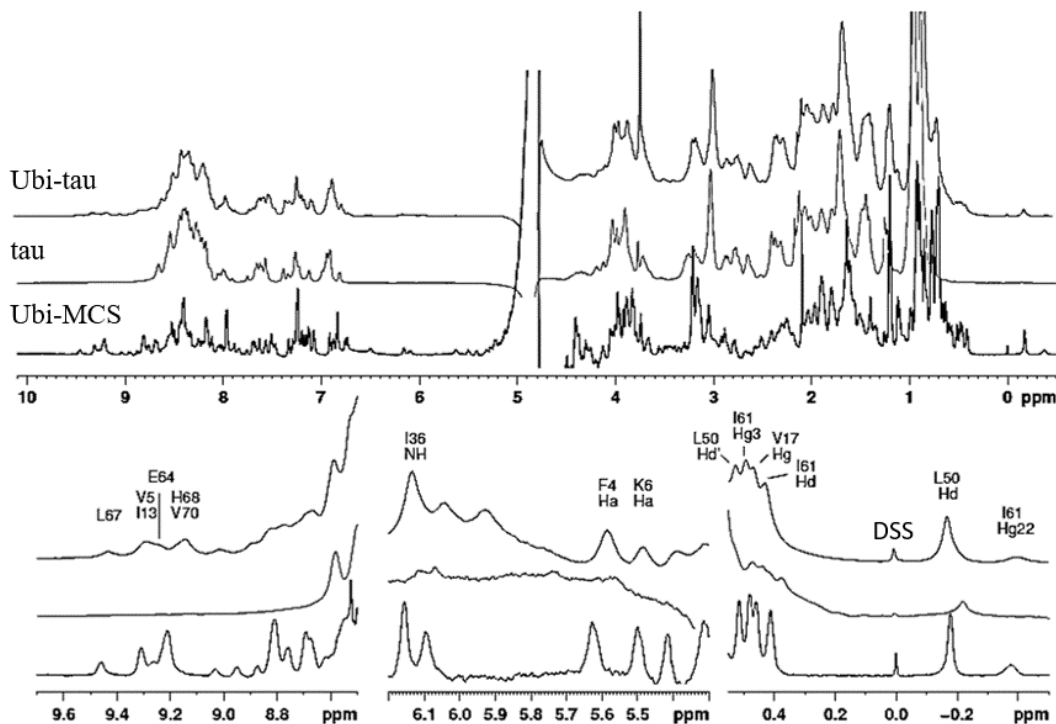


Figura 4(I)-4. Espectros de RMN monodimensionales de Ubi-tau, tau y Ubi-MCS. El espectro de la proteína de fusión aparece como la adición de picos presentes en los espectros de las proteínas por separado. El hecho de que se dé este patrón y no aparezcan señales nuevas, es indicativo de que no se ha generado ninguna interacción o cambio relevante. **Panel inferior)** Ampliaciones de distintas zonas del espectro, entre ellas aquella donde se encuentra la señal de referencia estándar para los ensayos de NMR (DSS o 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato sódico, derecha) y señales características de la ubiquitina. Nótese cómo estas señales aparecen más ensanchadas en el caso de Ubi-tau.

- Mantenimiento de la estructura amiloide: formación de estructura beta y fibras.

Para comprobar que tau continúa agregando cuando se inserta en la proteína portadora se llevaron a cabo ensayos de turbidimetría en el tiempo (*ver* **Figura 4(I)-9**). En paralelo, para comprobar la naturaleza amiloide de estos agregados se utilizó la tinción con CR (*ver* **Figura 4(I)-9**).

Dado que uno de los rasgos característicos de las proteínas amiloidogénicas es la formación de estructura secundaria- β a medida que avanzan en el proceso de agregación, si nuestra proteína de fusión sigue manteniendo las propiedades amiloidogénicas de MBD, debería ir generando estructura- β cuando es incubada en condiciones de agregación amiloide. Para testar si la proteína híbrida cumple este requisito, se monitorizaron los cambios en estructura secundaria en el tiempo mediante ensayos de CD. Para ello, las proteínas se incubaron a 37°C durante varios días, y se tomaron medidas los días 0, 2, 5 y 7. El contenido de estructura secundaria se estimó mediante deconvolución de los espectros usando el programa de análisis CDNN[49] y basándonos en los cambios producidos a 222 nm, ya que es a esa λ donde las señales provenientes de estructura- β producen cambios de elipticidad más pronunciados [64], resultando en una ganancia en estructura tipo β en el tiempo para tau y Ubi-tau (Figura 4(I)-5).

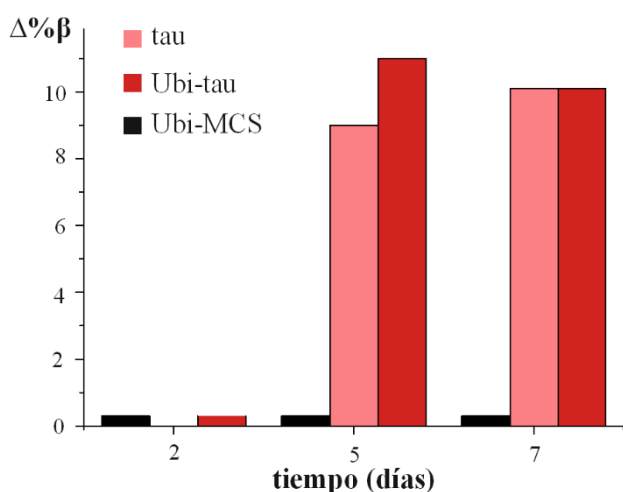


Figura 4(I)-5. Estimación de la ganancia en estructura- β en los diferentes días de incubación tras la deconvolución de los espectros de CD. Como se espera, la ubiquitina portadora aislada no sufre ningún cambio, actuando pues como control negativo (Ubi-MCS). Tau va enriqueciéndose en estructura secundaria cuando se encuentra aislada y cuando está presente dentro de su proteína portadora.

En los primeros días, la proteína híbrida no muestra ninguna evolución. Esto podría deberse a que fusión con la ubiquitina estaría ralentizando la evolución por generar algún impedimento estérico.

Una vez comprobado que nuestro sistema de protección mecánica no impide al monómero de tau evolucionar en estructuras secundarias vinculadas a la formación de amiloide (hebras y láminas- β), el siguiente paso sería comprobar si esto llega a traducirse finalmente en un ensamblaje de monómeros que dé lugar a la formación de fibras amiloides. Mediante *microscopía electrónica de transmisión* (TEM), se tomaron fotografías de las proteínas aisladas y de fusión, a diferentes tiempos de incubación (Figura 4(I)-6). Tanto tau como Ubi-tau fueron capaces de evolucionar a fibras

amiloides, aunque se encontraban estructuras con baja frecuencia. Esto posiblemente se deba al hecho de que tau es muy hidrofílica y soluble y su agregación *in vitro* suele dispararse con el uso de inductores como la heparina[65]. En ambos casos se encontró una alta heterogeneidad en el tipo de fibras formadas, tal y como se ha descrito para tau[66]. No se observaron diferencias entre ambas muestras, ni en la frecuencia ni en el tipo de estructuras. Dado que este ensayo pretendía ser meramente cualitativo, no se realizó ningún tipo de cuantificación.

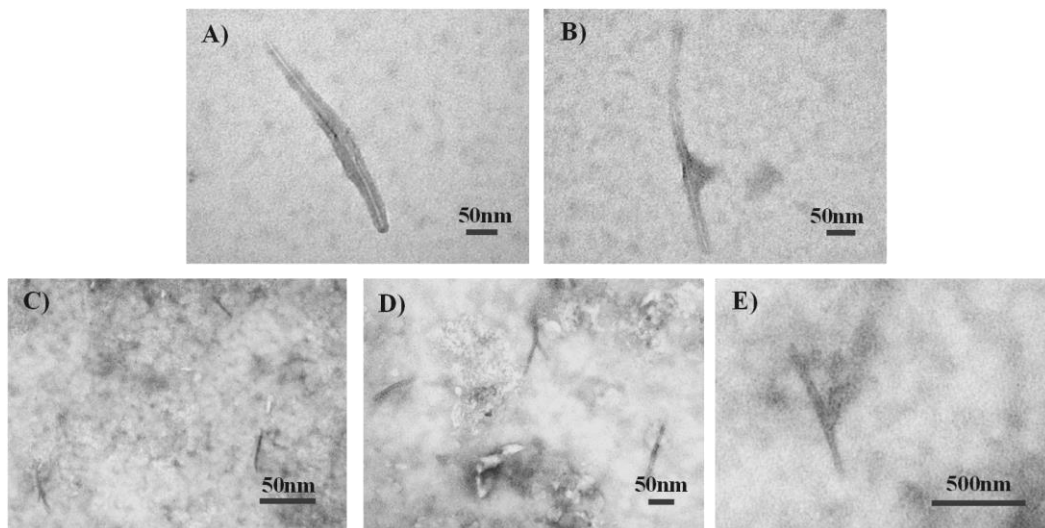


Figura 4(I)-6. Estudio de la fibrillogénesis de las proteínas tau mediante TEM. Las imágenes **A)** y **B)** pertenecen a tau y Ubi-tau, respectivamente, tras una semana de incubación a 37°C. Las dos fibras mostradas tienen una estructura muy similar. **C), D)** y **E)** pertenecen a Ubi-tau tras 4 semanas de incubación. La frecuencia de fibras encontradas aumenta con el tiempo de incubación, aunque ligeramente, posiblemente debido a la ausencia de heparina en la muestra. El control negativo Ubi-MCS no formó fibras amiloides.

- Mantenimiento de la ganancia de función tóxica de tau: anticuerpos conformacionales y microinyección en células de mamífero.

A lo largo de la cascada de agregación amiloidogénica diferentes estructuras se van formando y evolucionando en el tiempo. Se ha descrito que parte de estas estructuras pueden ser reconocidas por anticuerpos conformacionales. Más concretamente, se describió que los *anticuerpos conformacionales A11 y OC* reconocen específicamente oligómeros prefibrilares y conformeros fibrilares de $A\beta$, respectivamente[67]. Posteriormente, se ha comprobado que la presencia de estas estructuras es un rasgo común en el proceso de agregación amiloide de las aIDPs, dado que estos anticuerpos pueden ser usados con diferentes proteínas por ser dependientes de conformación e independientes de secuencia. Por otra parte, los oligómeros prefibrilares A11 han sido

descritos como aquellos que son solubles y causan una mayor toxicidad, encontrándose tanto en amiloides patológicos como funcionales[68]. Para evaluar si nuestro sistema es capaz de pasar por todas las fases, formando las mismas estructuras (especies) que haría tau aislada, se hizo un análisis por *immunodot blot* usando los dos anticuerpos que hemos mencionado. Tras 7 días de incubación, tanto tau como Ubi-tau dieron reactividad para los dos anticuerpos, indicando que, como cabe esperar, tau forma oligómeros prefibrilares y fibrilares y que también lo hace cuando se encuentra insertada en la ubiquitina hospedadora. La proteína híbrida muestra señales más débiles, especialmente en el caso de A11. Esto puede deberse a que el hospedador ralentiza la formación de estas estructuras, y su mayor presencia ocurriría a tiempos más prolongados de incubación. Otra posible explicación de este resultado es que la ubiquitina esté interfiriendo en el reconocimiento de las estructuras que tau esté formando y parte de éstas no queden expuestas al anticuerpo.

El objetivo principal del estudio de tau a nivel de monómero que persigue esta tesis es intentar identificar los **rasgos estructurales iniciales que desembocan en la toxicidad de este proceso**. Aunque los datos descritos hasta el momento indican que tau no pierde sus características estructurales en ninguna de las etapas de agregación amiloide cuando está insertada en Ubi-MCS, debemos estar seguros de que la estrategia propuesta para su estudio no interfiere con la toxicidad de tau. Para testar la toxicidad causada por la proteína de fusión, dado que tau es una proteína neurotóxica intracelular, se llevó a cabo la *microinyección* de las proteínas a estudiar en células de la línea COS-7 acompañadas de dextrano marcado con fluoresceína. La microinyección se realizó a los siete días de incubación de las proteínas, momento en el que se detectó la presencia de especies A11 reactivas, asociadas a toxicidad. Cada experimento se hizo por triplicado y con una microinyección media de 130 células por experimento. El marcaje permitía hacer un seguimiento de las células microinyectadas y calcular así la viabilidad celular. Los resultados muestran que las proteínas tau y Ubi-tau son capaces de producir muerte celular, con diferencias significativas con respecto a los controles (Figura 4(I)-7).

En resumen, la **bondad de la estrategia de la protección mecánica** para el estudio de tau por SMFS ha sido analizada desde varias perspectivas. Por un lado, hemos comprobado que la ubiquitina portadora mantiene sus propiedades estructurales y mecánicas cuando tau es insertada, algo que nos permite utilizarla como hospedador para nuestros experimentos. Por el otro lado, hemos chequeado cuidadosamente que tau en la proteína híbrida no ve modificados aquellos rasgos estructurales que lo hacen un amiloide tóxico. Finalmente, hemos comprobado que no

hay indicios de interacciones espurias entre Ubi y tau. Por todo ello, damos por validada nuestra estrategia.

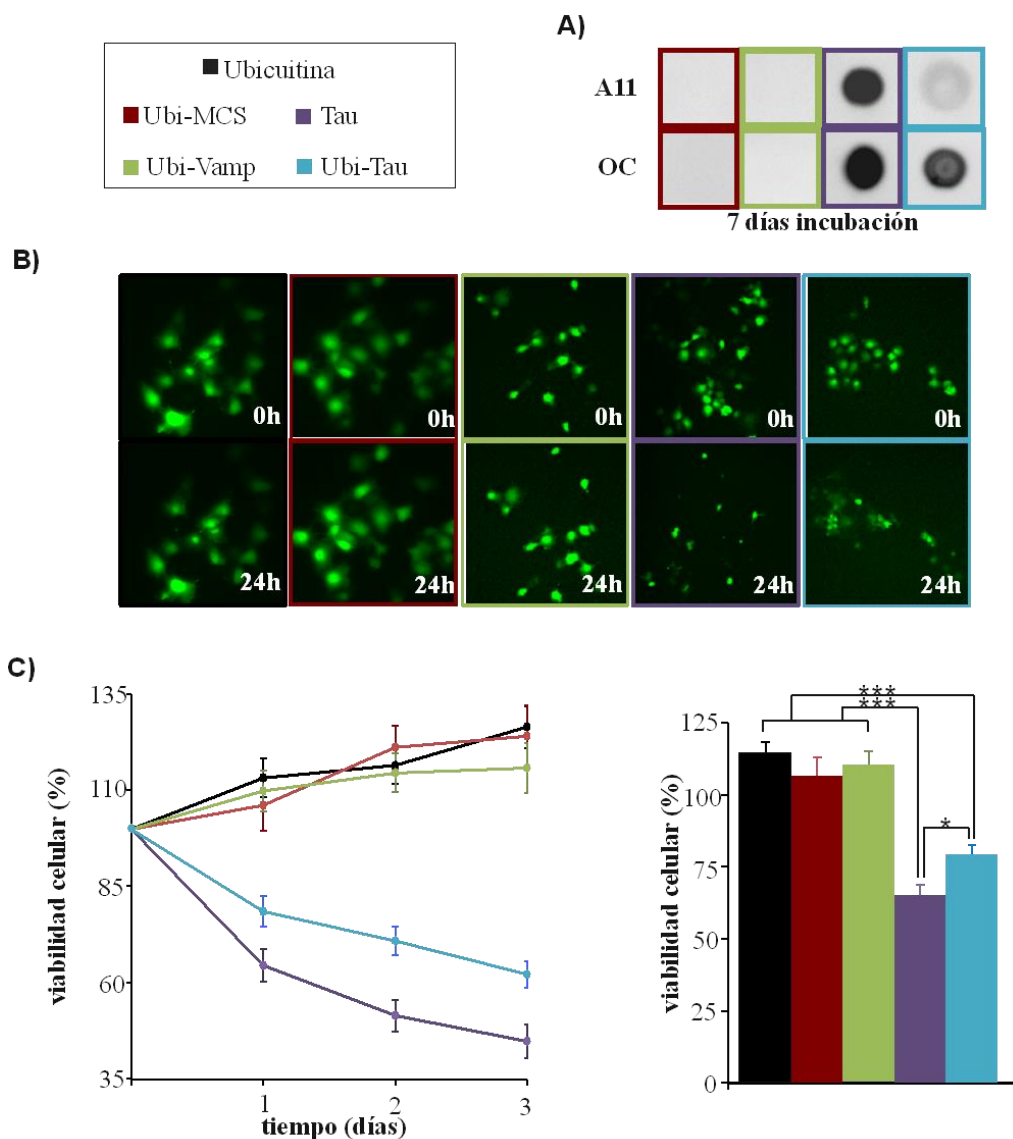


Figura 4(I)-7. Análisis de la conformación y toxicidad de la proteína de fusión Ubi-tau. A) Ensayo de inmunodot blot a 7 días de incubación muestra el reconocimiento por los anticuerpos conformacionales A11 y OC de tau aislada y albergada en la ubicuitina portadora. B) Micrografías de fluorescencia de las células COS-7 microinyectadas con dextrano marcado con fluoresceína y las proteínas estudiadas. 24 horas tras la microinyección se aprecia una reducción de células marcadas en aquellas placas donde se microinyectó tau y Ubi-tau. C) Curvas de supervivencia de las células microinyectadas tras 7 días de incubación y diferencias estadísticas en la viabilidad a los tres días (ANOVA de dos vías y test posterior de Bonferroni: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$). Los datos se representan como media \pm EEM.

La estrategia de la protección mecánica del vector pFS-2 queda validada para el estudio por SMFS del monómero de tau

Nanomecánica de tau wt

Aplicando la modalidad de SMFS del AFM al estudio de la estructura de un monómero, se pueden obtener dos parámetros directos acerca de su conformación: F_u , que hace referencia a la estabilidad mecánica de las barreras de resistencia al desplegamiento, y se mide directamente por la altura de los picos de fuerza en una curva fuerza-extensión; y ΔL_c , que es el aumento de la longitud de contorno tras el desplegamiento, medida por la distancia entre picos de fuerza tras el ajuste del espectro fuerza-extensión al modelo WLC. O, dicho de otra manera, F_u es por tanto la fuerza externa que debe aplicarse para romper la estructura formada mientras que ΔL_c es la longitud de proteína que formaba parte de dicha estructura y que acaba de quedar desplegada al romperse esa barrera.

Hasta la fecha, la estrategia de la protección mecánica diseñada en el vector pFS-2 es la única que garantiza un análisis fiable de proteínas amiloides mediante SMFS, ya que permite discernir aquellas señales que provienen de la IDP de aquellas originadas por interacciones inespecíficas, encontradas en la región proximal del espectro. Esto, junto con los marcadores de monomolecularidad y siguiendo criterios muy estrictos a la hora de la selección y análisis de registros (descritos en **Materiales y Métodos**) se garantiza que los datos seleccionados provienen del estiramiento de moléculas individuales de IDPs. En resumen, los registros que deben seleccionarse son aquellos donde el ΔL_c del portador es seguido, de forma consecutiva o no, por picos de fuerza cuya suma de ΔL_c s corresponda con la longitud total teórica de la proteína de fusión.

Sin embargo, al estirar un monómero de la proteína de fusión portador-huésped en dirección N-C terminal, habitual en los experimentos por SMFS, no se excluye la existencia de posibles interacciones de la IDP con el portador, con diferentes elementos del AFM (punta o sustrato) o con otras IDPs circundantes (interacciones intermoleculares previas a la formación de oligómeros y/o fibras). Dado que estamos interesados en la caracterización nanomecánica del monómero de tau, este tipo de interacciones artefactuales no deseadas constituyen una limitación. Es imprescindible

pues descartar la existencia de dichos posibles artefactos, por lo que deberemos realizar una amplia batería de controles específicos para que cada tipo posible y asegurar así la validez de la estrategia.

Todos los ensayos mostrados hasta este punto han tenido como objetivo este propósito. Además, el uso del pFS-2 ralentiza la fibrillogénesis al restringir los grados de libertad de la proteína insertada, ofreciendo una ventaja adicional al minimizar las interacciones intermoleculares durante la ejecución del experimento. Una vez que ya se ha validado la estrategia, se puede proceder con el análisis por SMFS de tau. El fin de estos experimentos es hacer un muestreo de las conformaciones que puede adoptar para su caracterización a nivel de monómero, intentar establecer una relación de este comportamiento con su naturaleza amiloide y, finalmente, intentar dilucidar cuál (es) de esas conformaciones del estado monomérico (el inicio de la cascada de agregación) es la(s) asociada(s) a la toxicidad.

Tras el análisis nanomecánico de 113 registros válidos, se observó que el 51% de estas moléculas había adquirido algún tipo de estructura y, concretamente, un 2,6% de estos registros pertenecían a eventos hiper-mecanoestables. Se observaron diferentes barreras mecánicas, y a menudo, varias por molécula, localizadas en diferentes posiciones. En la **Figura 4(I)-18 B y C** aparecen todos los valores de ΔL_c y F_u , tal y como se analizaron distintas aIDPs previamente en nuestro laboratorio [37, 69]. Dado que tras el desplegamiento de la ubicuitina portadora puede haber fragmentos de tau desordenados que aparezcan en nuestro registro antes de la ruptura de la siguiente barrera mecánica, hay un mayor número de datos para ΔL_c que para F_u . Concretamente, el histograma de longitudes se ha generado a partir de 134 datos, mientras que el de fuerzas cuenta con 74 eventos. La frecuencia de los valores de ΔL_c y F_u no sigue ninguna distribución (**Figura 4(I)-8, B**) y no se observa ninguna correlación entre ambos parámetros ni valores preferenciales (**Figura 4(I)-8, C**). Para esta búsqueda de correlación se utilizaron los valores de las barreras mecánicas junto con la longitud liberada siguiente. Por tanto, podemos concluir que **tau presenta un gran polimorfismo conformacional a nivel de monómero**. Este resultado es similar a lo observado para otras proteínas amiloides, tanto tóxicas como funcionales, estudiadas mediante SMFS con la misma estrategia[37, 69], lo que refuerza la idea de que este rasgo es algo **distintivo** de las proteínas amiloides en general.

**Tau presenta un gran polimorfismo
conformacional a nivel de monómero, sin
optar por ninguna estructura preferencial.**

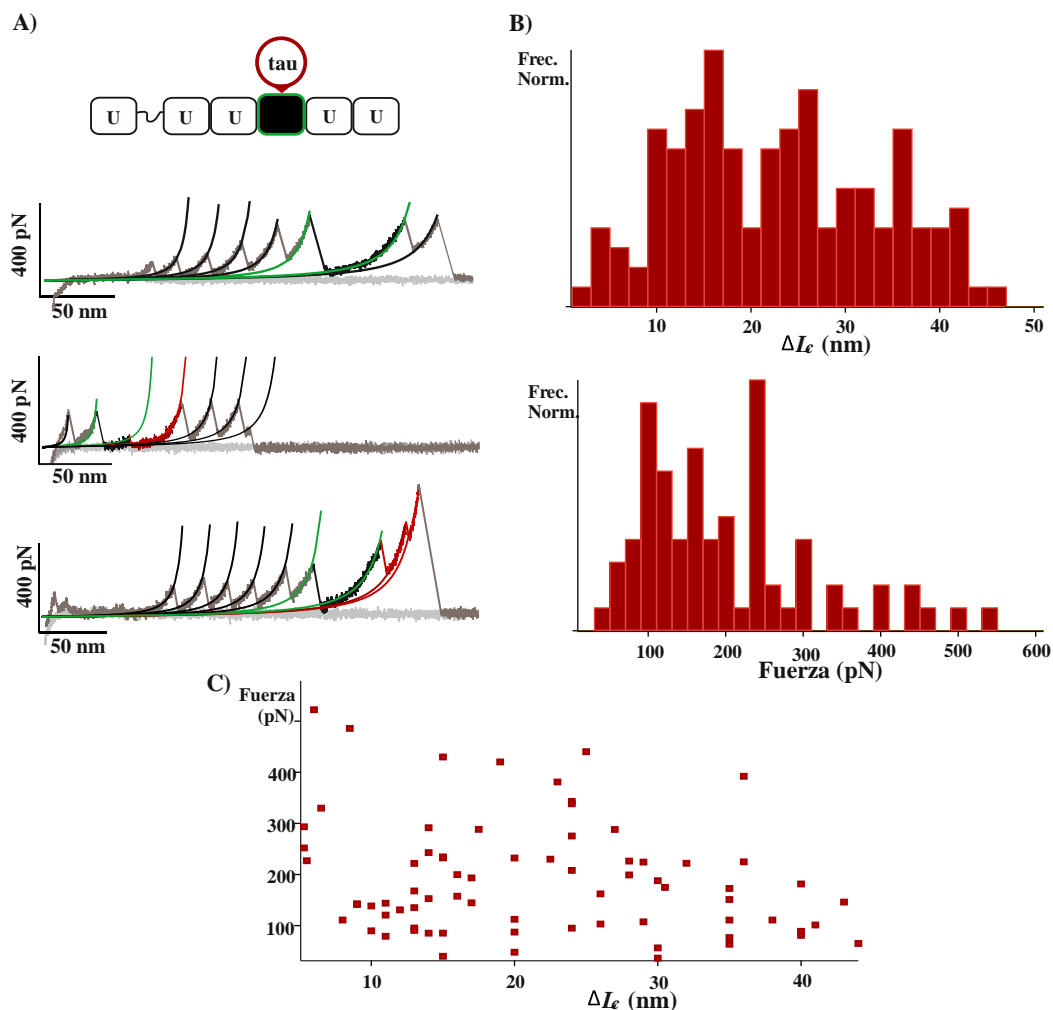


Figura 4(I)-8. Análisis nanomecánico del monómero de tau. A) Esquema del vector pFS-2 albergando tau y registros típicos de los tres tipos de conforméromos encontrados: RC, M e hM. El primer conforméromo mecanoestable del registro intermedio presenta una barrera mecánica de baja estabilidad que no podría ser identificado sin la protección mecánica de la ubiquitina portadora. El conforméromo hipermecanoestable del registro inferior presenta dos picos de fuerza con valores superiores a 400 pN, correspondientes a la ruptura de dos estructuras de alta mecanoestabilidad. B) Arriba, histograma de los valores ΔL_c . Tau es capaz de formar interacciones intramoleculares a lo largo de toda su secuencia, ya que las extensiones liberadas tras las rupturas de las barreras mecánicas aparecen por toda su longitud. Abajo, histograma de los valores F_u . Las estabildades de las estructuras formadas son muy heterogéneas, llegando a alcanzar valores superiores a los 400 pN, conforméromos que se definieron operacionalmente como hiper-mecanoestables (hM). C) Gráfico de dispersión entre ambas variables. No se observa ninguna correlación entre los valores de fuerza y extensión ni agrupamiento alguno de los mismos. Esto indica que **tau no tiende a formar ningún conforméromo preferencial**.

EFECTO DEL PÉPTIDO ANTIAMILOIDOGÉNICO QBP1

Como se ha mencionado en la Introducción, el péptido QBP1 es capaz de inhibir la agregación amiloide de varias NPs y produce la reducción de su polimorfismo conformacional a nivel de monómero[38], presumiblemente porque impide la formación de la conformación desencadenante de la cascada de agregación. Posteriormente, se comprobó que también era capaz de reducir el polimorfismo conformacional del monómero del prionoide funcional Orb2/CPEB (asociado a la consolidación de memoria), inhibir su agregación *in vitro*, y bloquear su función asociada a su oligomerización. Esto parece apoyar la idea de que muchas proteínas amiloides, tanto patológicas como funcionales, comparten bases moleculares al principio de la cascada amiloidogénica (comportamiento conformacional común), al menos a nivel de monómero.

Para profundizar en el estudio del polimorfismo de tau, decidimos testar el posible efecto de este péptido polivalente, pues representa una interesante herramienta para discernir entre rasgos comunes y no comunes de proteínas amiloides. El análisis de su efecto en tau podría ayudarnos a entender y caracterizar sus fluctuaciones conformacionales asociadas a la agregación y a relacionarla con otros amiloides.

Para ello, se hizo una primera aproximación monitorizando la agregación en el tiempo de las proteínas tau y Ubi-tau en presencia y ausencia de QBP1, mediante análisis de turbidez de las muestras a 405 nm. A esta λ nos encontramos en el espectro visible, donde no hay absorción por ningún grupo proteico, por lo que se establece que la dispersión de luz es debida a la formación de agregados. En la **Figura 4(I)-9** los puntos que aparecen en la gráfica son el resultado de la media de tres medidas de absorbancia, cuyo EEM aparece reflejado en las barras de error.

Como se observa, los valores de las medidas de absorbancia son muy variables, y esto es debido a varios motivos. La agregación amiloide *in vitro* no suele ser un proceso ideal, ya que junto con las estructuras amiloides se pueden encontrar estructuras amorfas que también pueden causar turbidez. Por otro lado, la dispersión de luz causada por las fibras no solo depende de la cantidad presente, sino también de su longitud, diámetro, agrupación entre ellas, morfología, etc. Por nuestros ensayos de microscopía electrónica, al igual que los resultados reportados en la bibliografía, tau forma agregados muy heterogéneos, algo que es compatible con la variabilidad encontrada. Para atenuar estas fluctuaciones y facilitar la interpretación de los datos, se calculó una línea de tendencia de media móvil de período 2. Como observamos, la turbidez tiende a aumentar en todas nuestras muestras a excepción del control, por lo que no se percibe ningún efecto de QBP1.

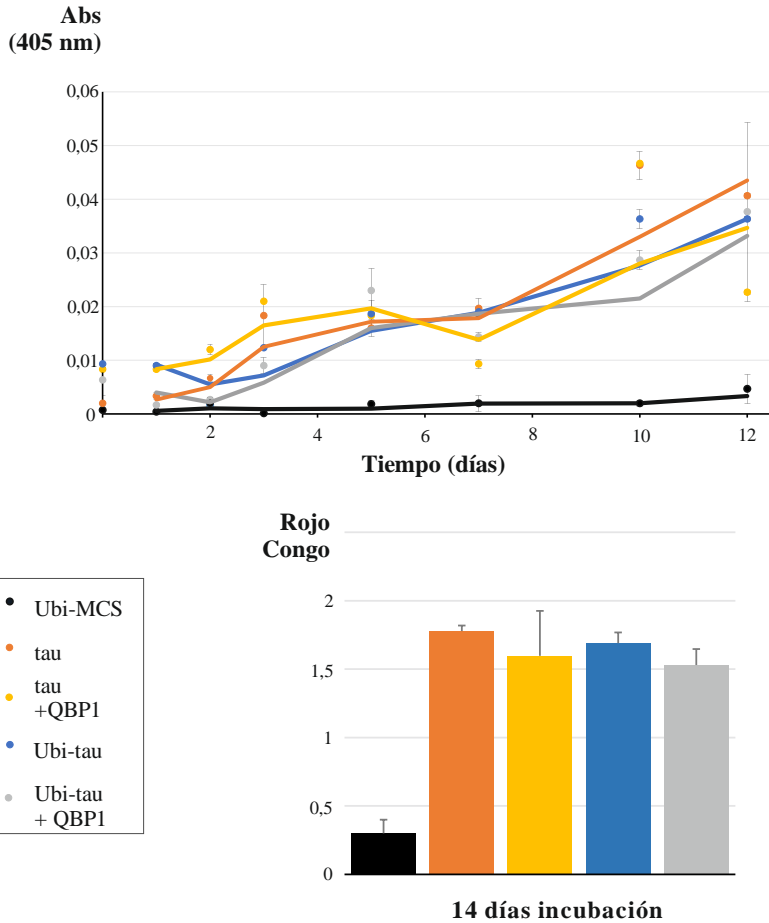


Figura 4(I)-9. Monitorización de la agregación amiloide en presencia de QBP1. Panel superior) Evolución en el tiempo de la agregación en las muestras que contienen tau (aislada, dentro de la proteína portadora, y en presencia y ausencia de QBP1). Los puntos representados provienen del promedio de tres medidas y la línea de tendencia de media móvil muestra un aumento progresivo de la turbidez en todos los casos. El ascenso de la absorbancia a 405 nm comienza a partir del segundo día, posiblemente cuando termina la fase de latencia, que en este caso se encuentra alargada al no haberse utilizado un agente inductor de la agregación. **Panel inferior)** El ensayo de unión a CR (n=3) tras 14 días de incubación muestra la formación de estructura amiloide en todos los casos, sin que haya diferencias significativas entre las muestras. Ambos ensayos indican que QBP1 no ejerce una inhibición de la agregación sobre tau.

Por lo indicado anteriormente, no parece muy recomendable tratar de sacar conclusiones a partir de estos datos; sin embargo, al tratarse un ensayo sencillo, es muy utilizado para apoyar datos obtenidos mediante otras técnicas. El CR es un agente de tinción específico de estructura amiloide, usado en diagnósticos post-mortem y análisis cualitativos mediante microscopía óptica. Además, éste puede ser usado con técnicas espectrofotométricas que permiten cuantificar la cantidad de estructura amiloide

presente. Al unirse el CR a una fibra, el entorno del cromóforo se ve modificado, produciendo un desplazamiento batocrómico (el CR libre muestra una λ_{\max} ~490 nm, mientras que al unirse a fibras amiloides su λ_{\max} es de ~520 nm)[52]. Para cuantificar la agregación amiloide, se realizó el ensayo de unión a CR. Tras 14 días de incubación de las muestras a 37°C, se observó formación de amiloide no inhibida por QBP1.

Para apoyar estos datos, se tomaron micrografías por TEM a diferentes tiempos de incubación (**Figura 4(I)-10**). De forma consistente con los resultados anteriores, se encontró formación de fibras con diferentes morfologías en todos los casos, sin apreciar diferencias entre ellos. Al tratarse un ensayo cualitativo, no se llevó a cabo ningún tipo de cuantificación.

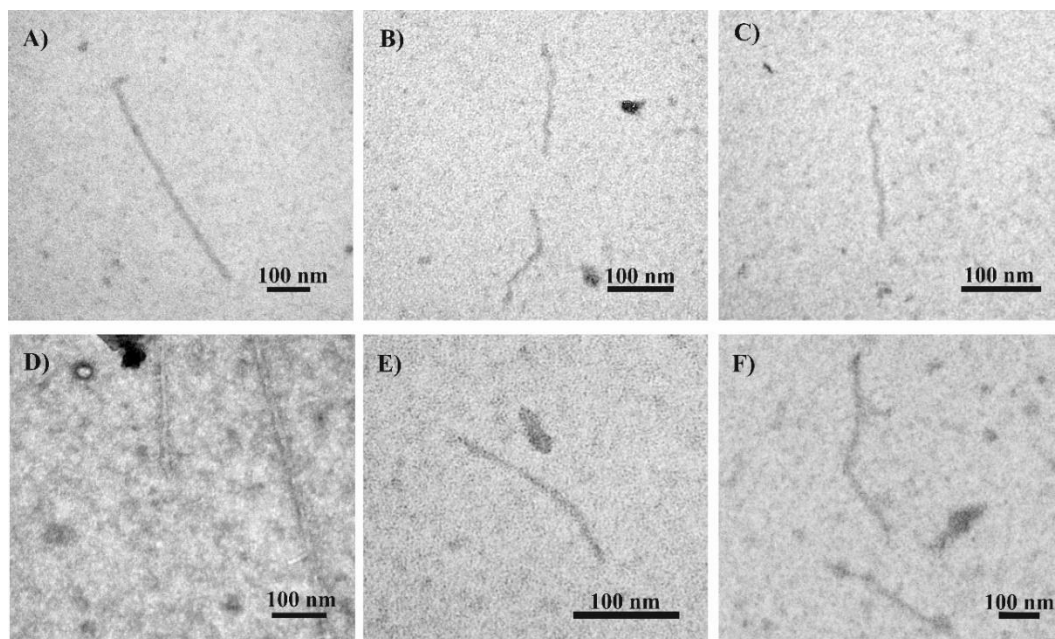


Figura 4(I)-10. Fibrillogénesis de Ubi-tau en presencia y ausencia de QBP1 mediante TEM. Las imágenes fueron tomadas tras 7 días de incubación a 37 °C. **A)** Tau forma fibras en ausencia y **B) y C)** presencia de QBP1. Observamos el mismo resultado en el caso de Ubi-tau. Las fibras observadas en **D) y E)** corresponden a Ubi-tau y **F)** son aquellas formadas en presencia de QBP1. El control Ubi-MCS no forma fibras amiloides.

Todos estos resultados nos indican que QBP1 no impide la agregación de tau. Para corroborar que tampoco causa un efecto en el monómero (especie descrita como diana farmacológica ideal, por encontrarse al principio de la cascada amiloide) se realizaron

algunos experimentos por SMFS y un análisis exploratorio con 33 moléculas. Se cuantificó un total de 21 moléculas estructuradas (67% de mecanoestables), frecuencia que no varía estadísticamente con la presentada por el monómero sin tratar. Esto se calculó aplicando el **test chi-cuadrado** con la **corrección de Yates (Tabla 2)**, ya que la tabla de contingencia cuenta con un sólo un grado de libertad y en nuestra muestra total están contabilizadas menos de 200 moléculas (ver **Materiales y Métodos**). Por otra parte, al igual que ocurre sin el uso del péptido, los valores de ΔL_c y F_u presentados por el monómero de tau son muy heterogéneos. Al relacionar las dos variables, tampoco se observa ninguna conformación preferencial o ausencia de valores que sugiriese que alguna región concreta de la proteína esté dejando de establecer contactos intramoleculares por actuación del péptido (**Figura 4(I)-11**). Todo esto indica que QBP1 no reduce el polimorfismo conformacional de tau.

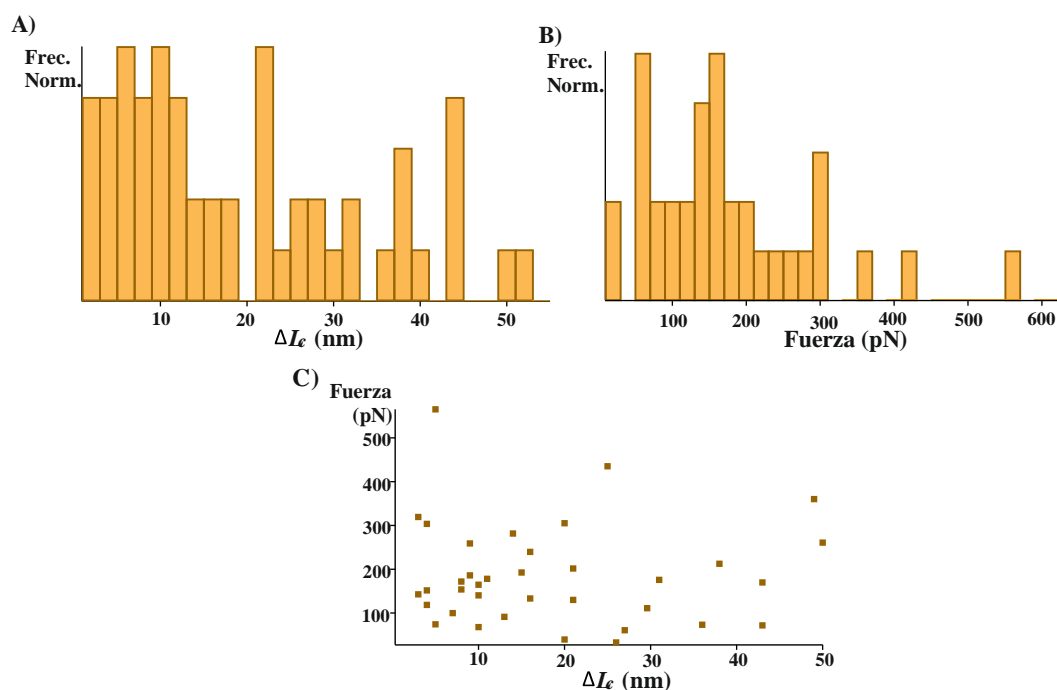


Figura 4(I)-11. Análisis exploratorio del polimorfismo conformacional del monómero tau en presencia de QBP1. Los histogramas de los valores de **A)** ΔL_c (n=57) y **B)** F_u (n=36) de los eventos mecanoestables no siguen ninguna distribución, encontrándose también fuerzas superiores a los 400 pN, como ocurre con tau en ausencia de QBP1. **C)** La dispersión de los puntos que relaciona ambos parámetros (n=36) confirma que se sigue manteniendo el alto polimorfismo conformacional sin cófómeros preferenciales previamente caracterizado para tau.

		- QBP1	+ QBP1	ΣN
NM	N observada	53	12	65
	Frecuencia esperada	50,41	14,59	
	f esperada - f observada	-2,59	2,59	
	Contribución a χ^2	0,09	0,30	
M	N observada	61	21	82
	Frecuencia esperada	63,59	18,41	
	f esperada - f observada	2,59	-2,59	
	Contribución a χ^2	0,07	0,24	
	ΣN	114	33	147
	χ^2			0,69
	Coefficiente Contingencia			0,07

Tabla 2. Tabla de contingencia sobre la dependencia de QBP1 en la población mecanoestable de tau. El valor de χ^2 obtenido y el coeficiente de contingencia cercano a 0 nos indica la ausencia de efecto de QBP1 sobre la estructuración en el monómero de tau. Este análisis será explicado en mayor detalle en la Sección “En busca del mecanismo de formación amiloide de tau”.

QBP1 no inhibe la amiloidogénesis de tau

EFECTO NANOMÉCANICO DE LAS MUTACIONES PROAGREGANTES Δ280K y P301L

Hasta ahora, todas las mutaciones estudiadas de proteínas neurotóxicas causantes de mayor agregación amiloide, toxicidad y neurodegeneración, se ha visto que presentan siempre el mismo efecto en el monómero: aumento del polimorfismo conformacional y aumento de las especies mecanoestables. Esta observación sirvió como base de la hipótesis mecánica sobre la causalidad estructural en la generación de toxicidad por NP en enfermedades neurodegenerativas. Para continuar con el análisis nanomecánico del monómero de tau e intentar esclarecer los mecanismos moleculares asociados a su agregación, procedemos con el análisis por SMFS de dos mutantes proagregantes causantes de FTDP-17: Δ280K y P301L.

Validación de la estrategia

Como hemos mencionado, es necesario validar la estrategia de la protección mecánica para cada proteína. Dado que para tau *wt* se realizó una amplia batería de experimentos demostrando que la estrategia es adecuada, la validación del uso de Ubi-MCS para las

variantes proagregantes de tau se confirmará únicamente con experimentos centrados en detectar los posibles cambios estructurales a nivel de monómero mediante técnicas poblacionales clásicas: CD y NMR.

Al igual que ocurría con tau *wt*, los mutantes aislados presentan un fuerte mínimo a 200 nm en el UV-lejano cuando son analizados por CD, mientras que la proteína de fusión presenta un espectro intermedio entre estos y los obtenidos únicamente con el portador. Por otra parte, se corroboró el estado plegado de la ubiquitina portadora de los mutantes mediante ^1H NMR (Figura 4(I)12).

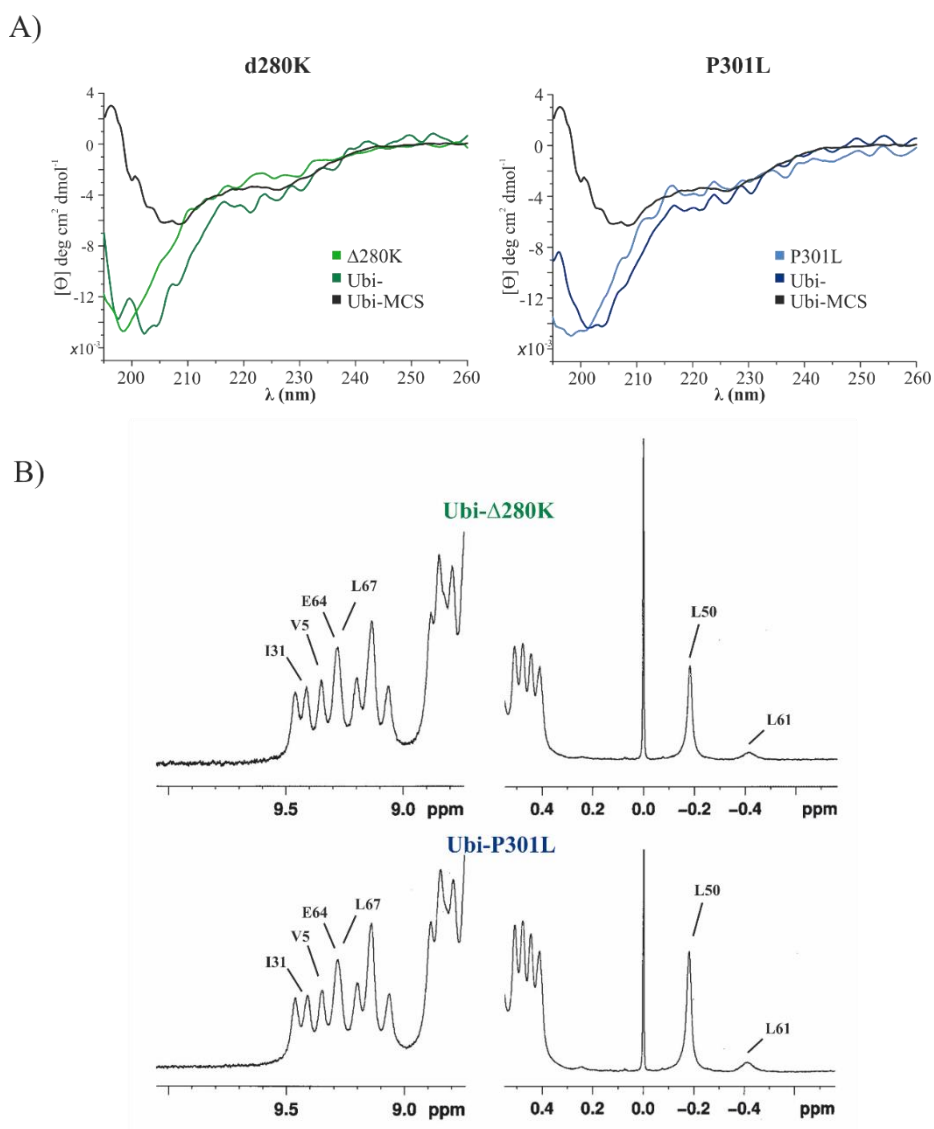


Figura 4(I)-12. Mantenimiento de las estructuras hospedador y huésped y ausencia de interacciones espurias en las proteínas de fusión Ubi-tau mutantes. A) Los espectros de las

proteínas de fusión obtenidos por CD muestran patrones intermedios a los obtenidos por ambas proteínas aisladas, siendo más intensa la contribución de la región desordenada procedente de los mutantes. **B)** Ampliación de espectros ^1H NMR de las proteínas de fusión de los mutantes, donde aparecen señales típicas del plegamiento de la ubicuitina portadora.

Nanomecánica de los mutantes

El estudio nanomecánico de los mutantes $\Delta 280\text{K}$ y P301L se llevó a cabo tras la selección (mediante los criterios ya publicados[37]) y análisis de 117 y 151 registros válidos, respectivamente. Sorprendentemente, al contrario de lo que ocurre con las anteriores proteínas neurotóxicas analizadas, estos mutantes proagregantes presentan un mayor número de moléculas sin estructura que su variante *wt* (63% y 78% para los casos de $\Delta 280\text{K}$ y P301L , respectivamente, *vs.* 49% para el caso del *wt*), lo que sugiere que el equilibrio está desplazado hacia la conformación de ovillo estadístico (RC). Por otro lado, las estructuras remanentes parecen seguir las mismas pautas que las de la variante no mutada: alto polimorfismo conformacional sin estructura preferencial (**Figura 4(I)-13**).

Los mutantes tóxicos $\Delta 280\text{K}$ y P301L , al igual que tau *wt*, presentan polimorfismo conformacional aunque su grado de estructuración es menor

El hecho de las NPs estudiadas anteriormente presentasen un equilibrio $\text{NM} \leftrightarrow \text{M}$ desplazado hacia M (confórmeros estructurados) en sus variantes causantes de toxicidad, es compatible con que su amiloidogénesis siga una ruta de crecimiento por nucleación, donde un confórmero estructurado es el desencadenante de la amiloidogénesis al actuar como núcleo. Por ello, cuando se inhibe la transición $\text{NM} \rightarrow \text{M}$ (por ejemplo, mediante el péptido QBP1) se inhibe la amiloidogénesis. Dado que los resultados obtenidos para tau son opuestos, el mecanismo del “*nucleation growth*” no explicaría la agregación de tau.

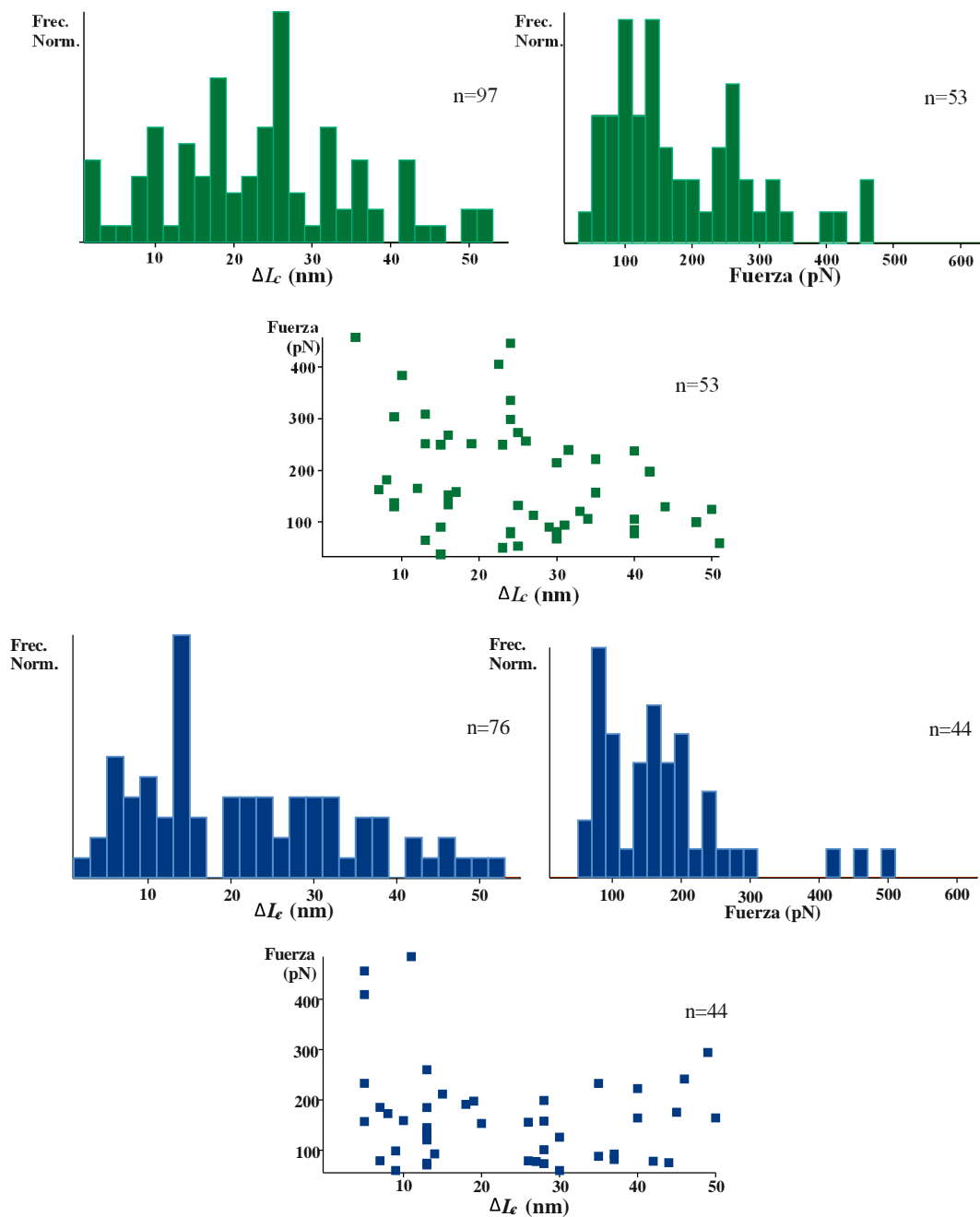


Figura 4(I)13. Análisis nanomecánico de los mutantes de tau. Histogramas de los valores ΔL_c y F_u de los mutantes proagregantes $\Delta 280K$ (verde) y P301L (azul) causantes de FTDP-17 y gráficas de dispersión enfrentando las dos variables. Al igual que ocurre con tau *wt*, existe un gran polimorfismo conformacional y no se observa ninguna estructura preferencial adoptada por ninguno de los mutantes.

EN BUSCA DEL MECANISMO DE FORMACIÓN AMILOIDE DE TAU

Para esclarecer las bases moleculares de la agregación amiloide de tau es necesario establecer previamente un modelo de conversión y ensamblaje de monómeros. Para ello, vamos a intentar elucidar los cambios en las fluctuaciones de tau asociadas a la agregación. Con este fin, se modulará la agregación (inhibiéndola o exacerbándola) y se registrarán los cambios estructurales que se produzcan en el monómero para su posterior análisis.

Búsqueda de una variable adicional con dependencia en la agregación

Tras el estudio de NPs por SMFS, las características que se modifican en el monómero con su propensión a agregar son *i)* la mayor aparición de moléculas estructuradas y *ii)* mecanoestabilidades más altas de las estructuras formadas (>400 pN)[37]. La “formación de estructuras” sólo puede tomar los valores “sí” o “no”, dependiendo de si se han registrado o no picos de fuerza tras el estiramiento de nuestra proteína. Por ello, es una variable *cualitativa dicotómica, dependiente* de la *variable independiente* “propensión a la agregación”. Anteriormente, la *propensión a la agregación* se ha modulado con la inserción de mutaciones puntuales proagregantes causantes de enfermedad, y el uso de un péptido anti-agregante que bloquea la amiloidogénesis.

En nuestro caso, en este punto, sólo tenemos la variable independiente “variantes de tau”, que por otra parte nos muestra efectos opuestos a los descritos anteriormente. Necesitaríamos pues un análisis más profundo y con más datos para intentar entender cómo funciona el sistema. Para ello, introducimos una variable nueva a estudiar. Se ha descrito cómo las condiciones del medio pueden modular la agregación de tau, siendo relevantes la fuerza iónica del tampón, su pH o el inductor heparina[64]. De este modo, para la variable “tampón” establecemos tres condiciones experimentales en las que varía el medio:

- **Antiamiloidogénico:** consistente en PBS a pH 7.4. Dada su elevada fuerza iónica y al ser tau muy hidrofílica, le obstaculiza la agregación.
- **Amiloidogénico:** 10 mM Tris-HCl a pH 10 + heparina. La fuerza iónica es muy baja y el pH coincide con el punto isoeléctrico de tau y sus variantes, que está en torno a 10, un factor que también promueve la agregación[64]. Por otra parte, se añade el inductor heparina en exceso molar 5:1.
- **Neutro:** 10 mM Tris-HCl a pH 7.4. Sería una condición intermedia entre las otras dos, en la que nos encontramos lejos del punto isoeléctrico de tau pero en

condiciones de baja concentración de sales. Es la condición en la que se han realizado los ensayos de SMFS para otras NPs.

Seguidamente, haremos un barrido de las conformaciones que el monómero de tau *wt* adopta al verse sometido a las diferentes condiciones experimentales. Una vez registrados todos los datos, incluidos los obtenidos de los mutantes, se procederá a hacer un análisis más profundo de los cambios estructurales que han tenido lugar.

Aparición de estructuras intramoleculares

Como se ha mencionado y está descrito en la literatura, las mutaciones en tau y el tampón pueden modificar su tendencia a agregar. Para testar si estas variables causan un cambio significativo medible en el comportamiento del monómero, se realizó un test de independencia χ^2 -cuadrado. Concretamente, nos centramos en evaluar la modulación en la aparición de estructuras intramoleculares en función de i) cambios en el medio (Tabla 3) y ii) mutaciones (Tabla 4).

Tablas 3 y 4. Análisis de la dependencia del medio y mutaciones en la población estructurada del monómero de tau. Se estudia la variable dependiente “confórmere”, que puede ser estructurado (M) o aparecer sin estructura (NM), en relación al “medio” (Tabla 3) y a las “variantes” de tau (Tabla 4) en el que se encuentra. Los valores obtenidos muestran dependencia entre ambas variables independientes y la dependiente, y los coeficientes de contingencia nos señalan un mayor efecto, aunque leve, de los mutantes sobre la frecuencia en la aparición de estructuras.

Tabla 3.

		wt			
		Antiamiloidogénico	Neutro	Proamiloidogénico	ΣN
NM	N observada	49	53	70	172
	Frecuencia esperada	58,91	59,44	53,65	
	f esperada - f observada	9,91	6,44	-16,35	
	Contribución a χ^2	1,67	0,70	4,98	
M	N observada	63	60	32	155
	Frecuencia esperada	53,09	53,56	48,35	
	f esperada - f observada	-9,91	-6,44	16,35	
	Contribución a χ^2	1,85	0,77	5,53	
ΣN		112	113	102	327
χ^2					15,50
Coeficiente Contingencia					0,21

Tabla 4.

		neutro			
		<i>wt</i>	$\Delta 280K$	P301L	ΣN
NM	N observada	53	73	119	245
	Frecuencia esperada	72,66	75,24	97,10	
	<i>f</i> esperada - <i>f</i> observada	19,66	2,24	-21,90	
	Contribución a χ^2	5,32	0,07	4,94	
M	N observada	60	44	32	136
	Frecuencia esperada	40,34	41,76	53,90	
	<i>f</i> esperada - <i>f</i> observada	-19,66	-2,24	21,90	
	Contribución a χ^2	9,59	0,12	8,90	
ΣN		113	117	151	381
χ^2					28,93
Coeficiente Contingencia					0,27

Al tratarse de tablas 2x3, estos análisis cuentan con dos grados de libertad. Usando la tabla de distribución de χ^2 , advertimos que valores $\geq 5,99$ señalan una dependencia entre las variables cualitativas analizadas. Dado que los valores calculados son superiores en ambos casos, podemos afirmar que tanto los diferentes tampones escogidos como las mutaciones seleccionadas, provocan cambios estadísticamente significativos en el registro de confórmers mecano- y no-mecanoestables. Por otro lado, el **coeficiente de contingencia**, que mide el grado de relación entre las dos variables de la tabla, nos indica que son las mutaciones puntuales las que juegan un papel más relevante en la alteración de la frecuencia de formación de estas estructuras intramoleculares en tau.

Una vez que hemos comprobado que las variantes y los tampones escogidos modulan el comportamiento nanomecánico de tau de forma significativa, procedemos a analizar las variaciones en el grado de estructuración de tau a dos niveles: i) aparición de confórmers mecanoestables dentro de una población y ii) número de estructuras dentro de una molécula (**Figura 4(I)14**). Este último viene determinado por la ruptura de interacciones en tau en una o varias regiones de la proteína, que generan uno o varios picos de fuerza cuando ésta es completamente desplegada.

Los resultados de los nuevos experimentos realizados y su análisis junto con el de los datos previos, muestran una tendencia clara. En condiciones en que es menos favorable la agregación de tau, ya sea porque tau no posee ninguna mutación o porque se encuentra en un medio con alta fuerza iónica y alejada de su punto isoeléctrico, el porcentaje de eventos mecanoestables aumenta, así como el número de barreras mecánicas encontradas en una molécula. Por el contrario, ante las condiciones opuestas, tanto por variante de nuestra proteína como por condiciones en el medio, tau

comienza a adoptar más preferentemente un comportamiento de RC, estando este estado asociado, por tanto, a su agregación amiloide.

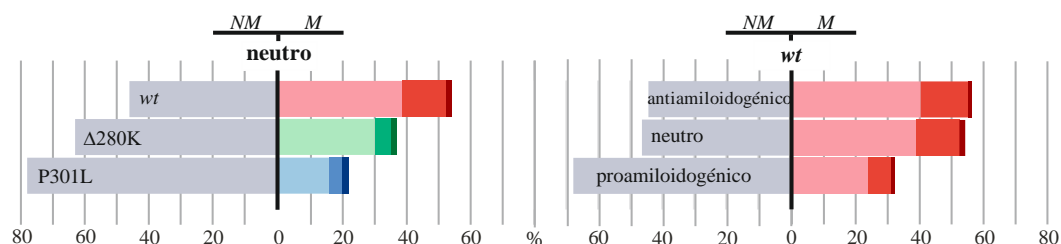


Figura 4(I)14. Cuantificación de las estructuras registradas. La frecuencia de población desestructurada, no mecanoestable (NM) aparece en gris y separada de la estructurada mecanoestable (M) que se muestra en color, dividiéndose en subpoblaciones que presentan 1, 2 o 3 picos de fuerza y que se representan como tonalidades de menor a mayor intensidad, respectivamente. Las frecuencias aparecen marcadas en el eje x. **Izquierda)** Representación de los confórmeros previamente registrados de tau wt y sus mutantes en un tampón neutro, recogiendo además el número de eventos de fuerza. En este caso se puede ver no sólo que la población desestructurada aumenta en los mutantes, sino que también disminuye el número de estructuras por molécula en las mecanoestables. **Derecha)** Comportamiento de tau wt en diferentes medios. Aunque los cambios no son tan pronunciados, el número de estructuras aumenta en el tampón antiamiloidogénico y disminuye fuertemente en la condición proamiloidogénica.

La formación de estructuras intramoleculares está inversamente relacionada con la propensión a la agregación amiloide.

Caracterización de las estructuras remanentes

Aunque los datos anteriores apuntan a que el **ovillo estadístico** es el confórmero clave que propicia la agregación amiloide, su estudio, al menos por SMFS, no puede aportarnos ninguna información nueva, pues sus valores de ΔL_c y F_u son siempre los mismos. Por ello, el siguiente paso de nuestro estudio va a consistir en analizar las estructuras remanentes en el monómero de tau. El objetivo será intentar entender cómo se da esa *transición en el comportamiento "proteína con estructura \rightarrow ovillo estadístico"* e incluso, intentar discernir si se llega a adoptar o eliminar alguna conformación preferencial que sea clave en el inicio del proceso amiloide.

Para hacer este análisis, vamos a centrarnos en la primera barrera mecánica que nos encontramos al desplegar la proteína, ya que es ésta la que marca donde finaliza la parte desordenada, vinculada a la agregación.

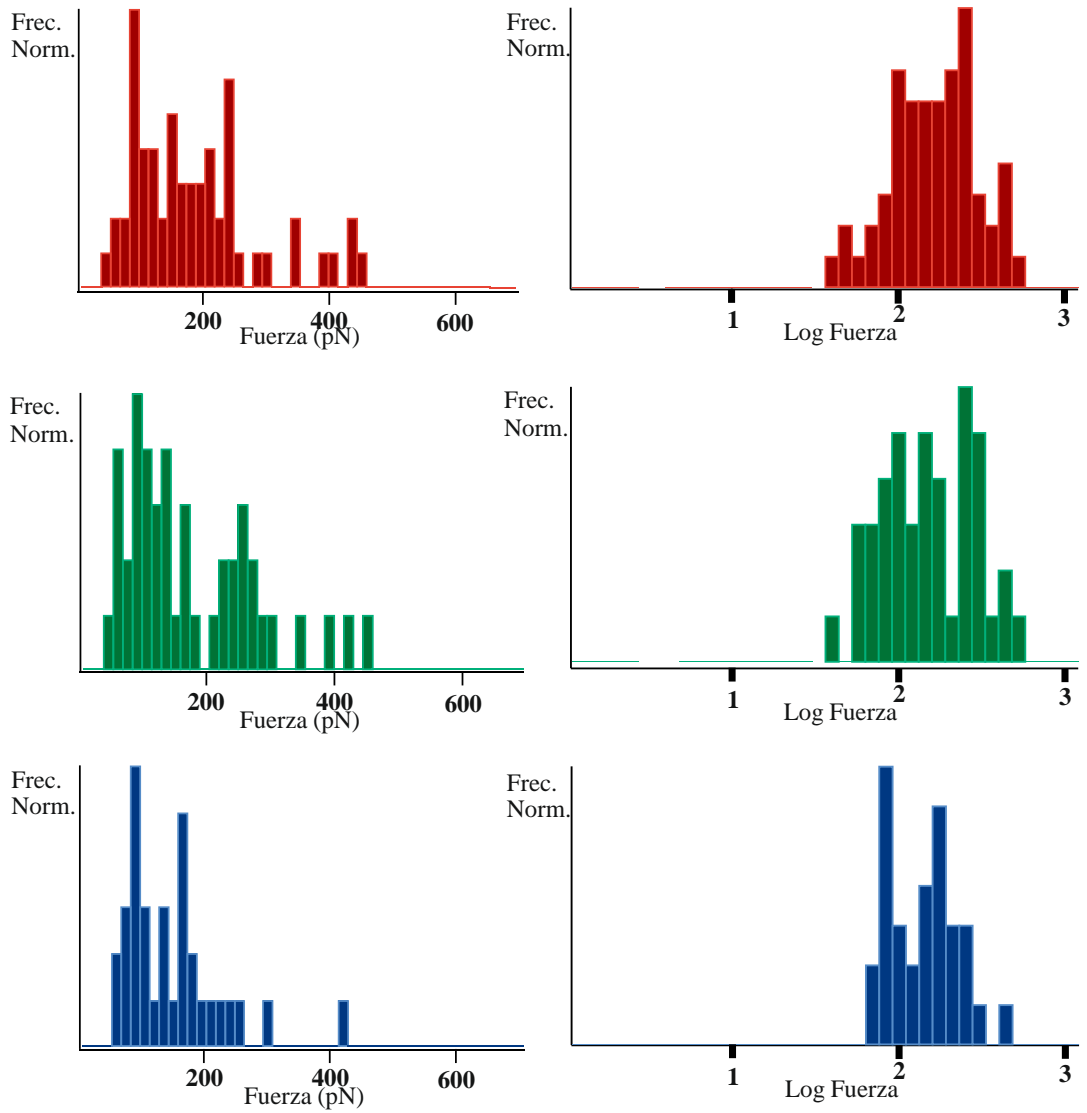
Papel de las mutaciones en la formación de la primera barrera mecánica.

Se seleccionaron los datos correspondientes al “pico 1” de los eventos mecanoestables. Se analizaron por separado los valores de F_u y ΔL_c previos al primer pico de fuerza, por tanto, el número de datos analizados en cada caso (n) será el mismo que el número de eventos mecanoestables en cada condición. Al aislar las fuerzas del primer pico de aquellas estructuras que se despliegan después, vemos que los valores de F_u se ajustan a una **distribución normal logarítmica**. Para comprobar si las distintas secuencias de tau modulan de diferente manera las estabildades de las estructuras formadas, se compararon estas poblaciones por **test paramétricos**, transformando previamente la población a una distribución normal tomando logaritmos para cada dato. Tras la transformación, se realizó un **ANOVA** de una vía y posterior **test de Tukey**, que nos informa de que no hay diferencias significativas entre los tres grupos (**Figura 4(I)-15**).

Por otro lado, la longitud previa a la primera barrera mecánica, hace referencia a los residuos aminoácidos que quedan desordenados en la proteína plegada. Así, el tamaño de la estructura formada correspondería a longitud completa de la molécula sin esa ΔL_c inicial. Al igual que ocurría en los análisis previos donde se incluían todas las medidas de los ΔL_c s, se observan unos valores muy heterogéneos, indicando estructuras de diferentes tamaños que barren toda la secuencia de tau (**Figura 4(I)-16**). Ya que los valores adquiridos no pueden ajustarse a ninguna distribución, la comparación entre estas poblaciones debe darse por análisis no paramétricos. El test de Kruskal-Wallis nos revela que estas mutaciones no ejercen un papel en la modulación del tamaño de las estructuras formadas.

Los mutantes modulan la cantidad de moléculas estructuradas en una población; sin embargo, no afecta al tipo de estructuras remanentes, ni en cuanto al tamaño ni en cuanto su mecanoestabilidad.

A)



B)

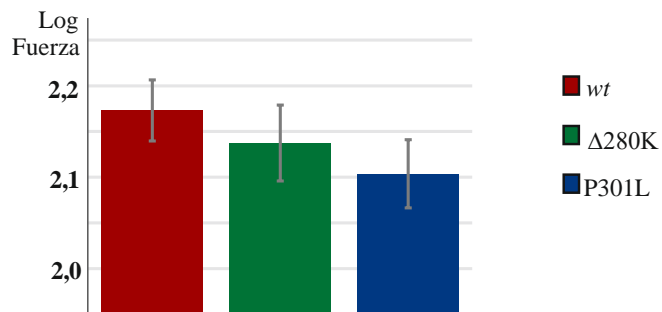


Figura 4(I)-15. Análisis de las estabildades mecánicas de la primera barrera mecánica en las secuencias de tau y sus variantes. A) Los valores de F_u siguen una distribución normal

logarítmica[70] (izquierda), por lo que pueden transformarse a una distribución normal tomando logaritmos (derecha). **B)** Medias y EEM de las distribuciones de fuerza transformadas. No existen diferencias estadísticas entre grupos.

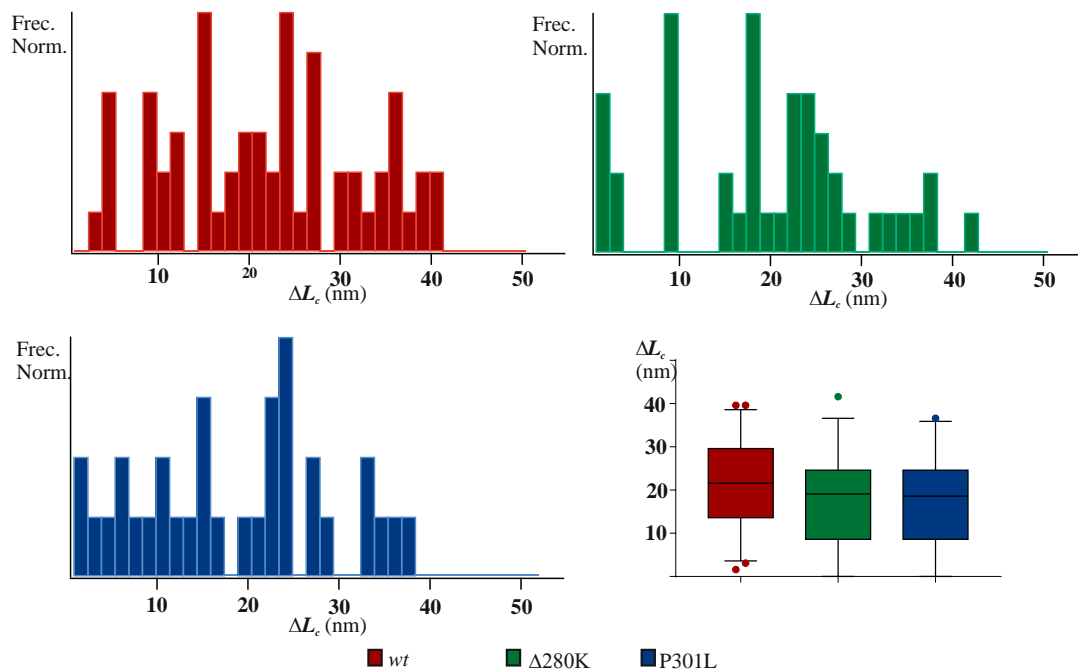


Figura 4(I)-16. Análisis de las longitudes desordenadas previas a la primera barrera mecánica. La distribución de ΔL_c es muy heterogénea tanto para tau *wt* como para sus mutantes. La comparación de poblaciones mediante *test no paramétricos de Kruskal-Wallis* nos informa de que no existen diferencias significativas entre ellas.

Papel del medio en la formación de la primera barrera mecánica

Una vez estudiado cómo las mutaciones proagregantes de tau intervienen en el polimorfismo de las estructuras ya generadas (es decir, no tienen ningún efecto), procedemos a hacer el mismo tipo de análisis evaluando esta vez el impacto que ejercen los diferentes medios en los que se encuentra tau.

El análisis de los valores transformados de fuerza nos indica que hay un cambio relevante en la estabilidad de las estructuras cuando se encuentran en el tampón que propicia la amiloidogénesis (**Figura 4(I)-17**). El descenso de la estabilidad es notable. Estos confórmeros estructurados pero de poca estabilidad, podrían ser confórmeros en ruta hacia el confórmero desplegado que, según todas las evidencias, sería el confórmero competente amiloide. De ser así, al encontrarnos en una condición extrema

que favorece fuertemente la agregación, este número de confórmers *on-pathway* aumentaría fuertemente, provocando esta diferencia en los valores F_u de la población.

En cuanto al análisis de las distancias, se observa cierta variación entre las poblaciones registradas en el medio antiamiloidogénico y neutro (**Figura 4(I)-18**). Dado que el cambio es mínimo y no está asociado a la agregación, asumimos que esta leve diferencia debe ser consecuencia colateral de otras características físico-químicas y que no nos aporta información relevante para explicar el proceso de agregación.

El resultado del análisis puede parecer paradójico, ya que anteriormente se comprobó que son los mutantes los que más modulaban la probabilidad de encontrar eventos estructurados. Sin embargo, aunando todos los datos, parece que las mutaciones juegan un papel mayor en modificar el balance en la formación de estructuras, mientras que el medio tiene un efecto menor en este sentido, aunque puede alterar el tipo de estructuras que se forman.

La población mecanoestable no muestra cambios entre las distintas variantes de tau, ni cuando nos centramos en sus valores de ΔL_c ni de F_u , aunque sí se ve afectada por los cambios de tampón. Se registran ciertas variaciones en las extensiones de las estructuras formadas, cuando se pasa del medio antiamiloidogénico al neutro; y la estabilidad de las mismas disminuye fuertemente con el cambio del entorno neutro al proamiloidogénico.

Las mutaciones en tau disminuyen, con mayor efecto que el medio, el número de estructuras formadas en el monómero. La condición proamiloidogénica, además, desestabiliza las estructuras remanentes.

CARACTERIZACIÓN DE LOS MUTANTES ASOCIADOS A FTDP-17

Las mutaciones $\Delta 280K$ y $P301L$ han sido utilizadas como variables que aumentan la agregación de tau, convirtiéndose así en una herramienta que ayuda a entender el comportamiento del monómero en condiciones que exacerban la patología. Sin embargo, como se comentó en la Introducción, estos mutantes son causantes de FTDP-17 familiar, por lo que tienen relevancia suficiente como para ser objeto de estudio en sí mismos, ya que están asociadas a formas familiares de la enfermedad (que suponen un 40% de los casos)[28].

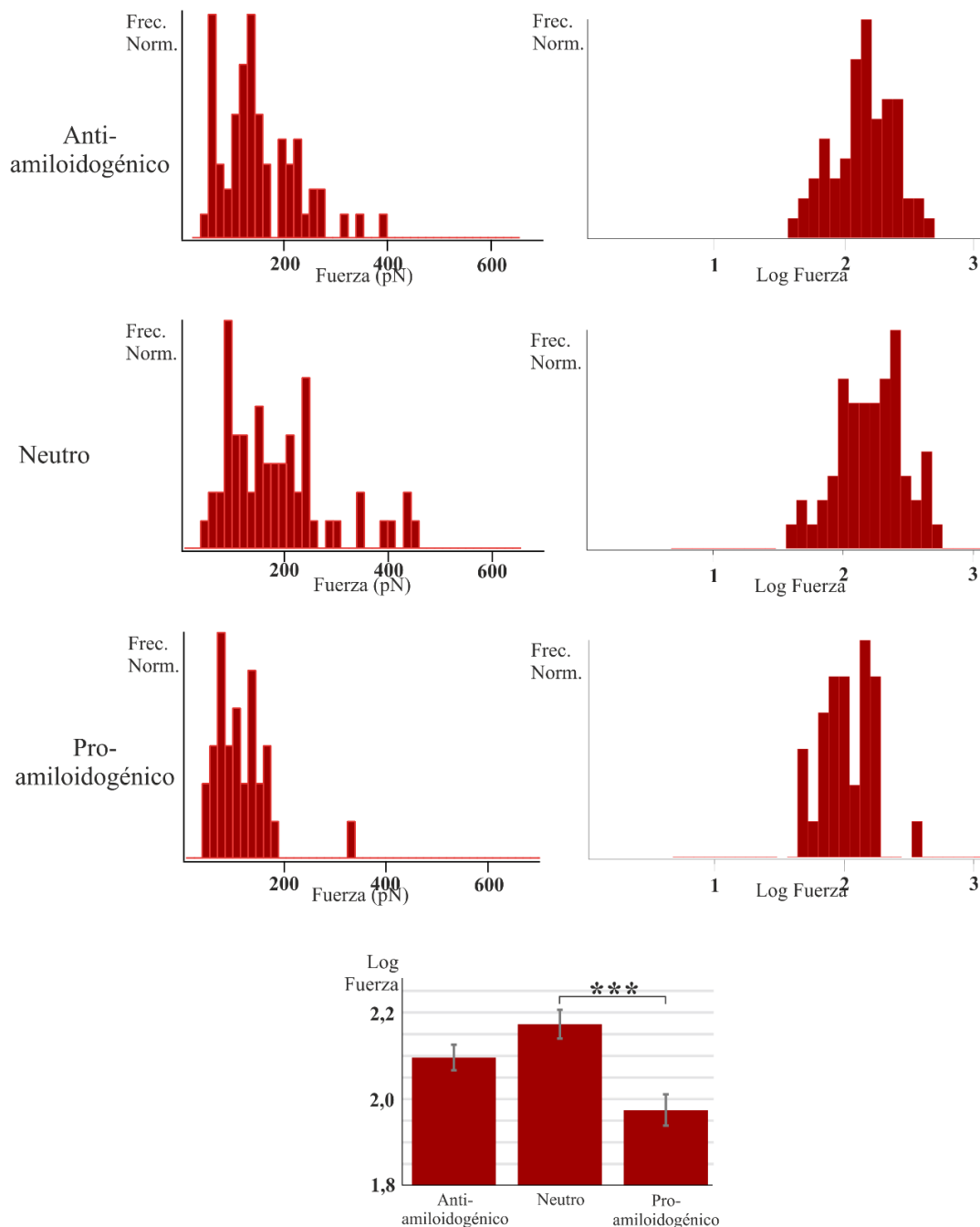


Figura 4(I)-17. Estabilidad de las estructuras formadas por tau *wt* en presencia de diferentes medios. Se muestran los valores de F_t con sus respectivas transformaciones y posterior análisis comparativo. Cuando las moléculas pasan de un medio neutro al proagregante sus estructuras sufren un acentuado descenso en la estabilidad.

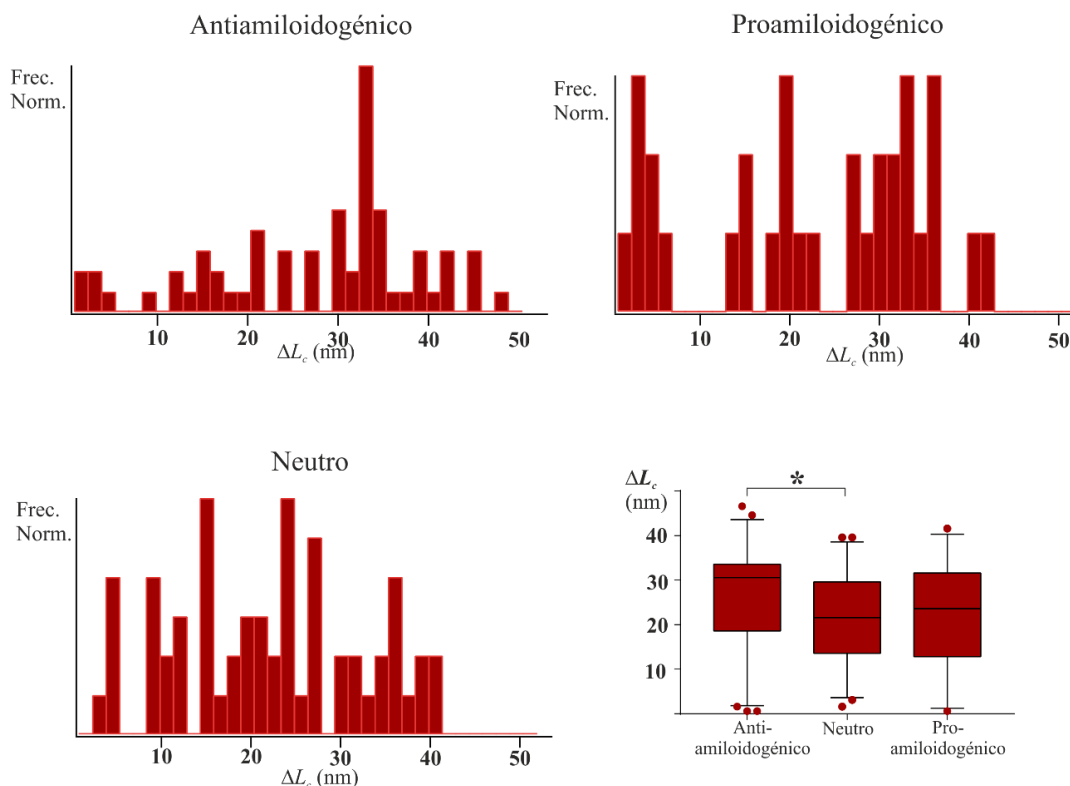


Figura 4(I)-18. Caracterización y comparación de las poblaciones de ΔL_c generadas por la ruptura de la primera barrera mecánica de tau cuando se encuentra bajo el efecto de diferentes medios. Las longitudes vuelven a ser heterogéneas y a cubrir toda la secuencia de residuos de la molécula. Sólo se observa una leve diferencia entre las poblaciones generadas por los medios menos asociados a la amiloidogénesis de tau.

Aparición de estructuras intramoleculares en función del medio

El efecto común de las mutaciones estudiadas es la agregación exacerbada de tau. Sin embargo, no sólo provocan un simple efecto potenciador de la amiloidogénesis. Los datos existentes parecen indicar que las variaciones introducidas en carga y/o hidrofobicidad modulan la agregación hacia una formación de estructuras determinadas en cada caso y que, además, el proceso presenta cinéticas de agregación diferentes. El origen de esta modulación, es decir, los cambios que sufren los monómeros mutantes con respecto al *wt* es un mecanismo no caracterizado, al menos experimentalmente. Con el fin de abordar esta cuestión, se analizarán las variaciones producidas en el polimorfismo conformacional de ambas mutaciones puntuales siguiendo los mismos pasos que realizados para tau *wt*.

En primer lugar se va a comprobar si los cambios en el medio afectan también a la frecuencia en la que la población se estructura (**Tablas 5 y 6**). De ser así, se procederá a cuantificar el número de estructuras intramoleculares en cada caso (**Figura 4(I)-19**).

Tablas 5 y 6. Análisis de dependencia χ^2 de los distintos medios asociados a la agregación sobre la población M/NM de los mutantes $\Delta 280K$ y P301L. Tras el cálculo de las tablas de contingencia se demuestra en ambos mutantes la relación existente entre el tipo de medio y el grado de estructuración de la población monomérica.

Tabla 5.

		$\Delta 280K$			
		Antiamiloidogénico	Neutro	Proamiloidogénico	ΣN
NM	N observada	100	73	75	248
	Frecuencia esperada	115,45	71,47	61,08	
	f esperada - f observada	15,45	-1,53	-13,92	
	Contribución a χ^2	2,07	0,03	3,17	
M	N observada	89	44	25	158
	Frecuencia esperada	73,55	45,53	38,92	
	f esperada - f observada	-15,45	1,53	13,92	
	Contribución a χ^2	3,24	0,05	4,98	
ΣN		189	117	100	406
χ^2					13,54
Coeficiente Contingencia					0,18

Tabla 6.

		P301L			
		Antiamiloidogénico	Neutro	Proamiloidogénico	ΣN
NM	N observada	45	119	58	222
	Frecuencia esperada	66,47	100,37	55,17	
	f esperada - f observada	21,47	-18,63	-2,83	
	Contribución a χ^2	6,93	3,46	0,15	
M	N observada	55	32	25	112
	Frecuencia esperada	33,53	50,63	27,83	
	f esperada - f observada	-21,47	18,63	2,83	
	Contribución a χ^2	13,74	6,86	0,29	
ΣN		100	151	83	334
χ^2					31,43
Coeficiente Contingencia					0,29

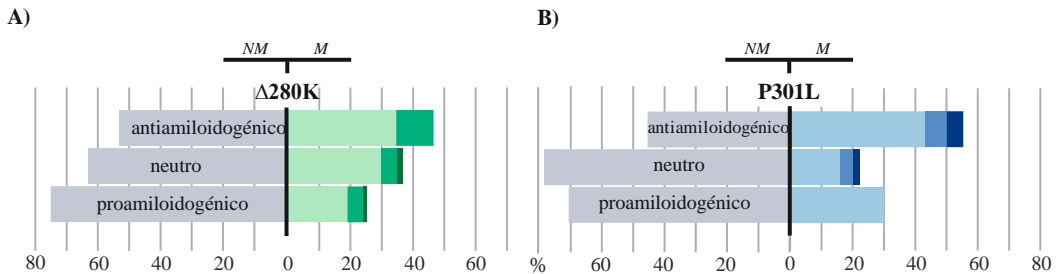


Figura 4(I)-19. Frecuencia del número de estructuras en $\Delta 280K$ y P301L bajo el efecto de los distintos medios. A) El mutante $\Delta 280K$ muestra un descenso gradual de estructuras a medida que cambia el carácter agregante del tampón. **B)** El descenso en la fuerza iónica se traduce en una brusca caída de los eventos mecanoestables en P301L. En cambio, el paso al medio proamiloidogénico sólo afecta levemente, disminuyendo la frecuencia de las estructuras intramoleculares.

El análisis muestra que ambos mutantes se ven afectados por los cambios en las condiciones del medio. Se observa una desaparición progresiva de estructuras en $\Delta 280K$ con la tendencia proamiloidogénica del medio, tanto para el número de moléculas totales mecanoestables, como para el número de barreras mecánicas dentro de ellas. Esto no ocurre de la misma manera en el caso de P301L. Se registró un gran descenso en la generación de moléculas estructuradas con la bajada en la fuerza iónica, siendo éste el parámetro que más modula el grado en el que se estructura la población de P301L. El aumento de pH a su punto isoelectrico y la adición de la heparina impide la aparición de más de un pico de fuerza (**Figura 4(I)-19**). Así, igual que ocurría en el *wt*, se observa una tendencia a la desaparición de estructuras en los mutantes a medida que se favorecen las condiciones para la amiloidogénesis. En base a estos datos y a los anteriores podemos concluir, por tanto, que el **primer paso** para la agregación amiloide de tau (en todas sus variantes) es la **pérdida de contactos intramoleculares**. De esto se deduce que el monómero no debe plegarse y formar interacciones consigo mismo, sino que debe quedar expuesto al medio, expandido. Por lo que la **conformación monomérica desestructurada es la desencadenante de la cascada de agregación amiloide de tau**. Cabe destacar que la frecuencia de población desestructurada es similar en las tres secuencias cuando las condiciones son proamiloidogénicas (*wt* = 68%; $\Delta 280K$ = 75%; P301L = 70%). Esto parece indicar que el *wt* puede desplazar su equilibrio $NM \leftrightarrow M$ hasta alcanzar un grado de desestructuración propio de un mutante patológico, siempre y cuando se encuentre en unas condiciones extremas que lo favorezcan. Otra cuestión a tener en cuenta es en qué medida puede modularse el equilibrio y cuándo se producen los cambios. El **espectro de modulación de la población**

desestructurada (es decir, el porcentaje de la población que es capaz de plegarse/desplegarse en función de las condiciones o hasta dónde puede desplazarse el equilibrio $NM \leftrightarrow M$) **es casi idéntico** en los tres casos ($wt = 20\%$; $\Delta 280K = 22\%$; $P301L = 25\%$). La **diferencia entre ellos radica en cómo les afecta las distintas condiciones**. El *wt* desplaza su equilibrio hacia la conformación desordenada cuando se le expone a las condiciones extremas; sin embargo, los mutantes muestran este desplazamiento en condiciones más suaves, siendo esto algo que explicaría su mayor carácter proagregante.

Cambios en las estructuras en función de medios con distintas tendencias de agregación

La delección de la lisina en $\Delta 280K$ hace que las características de las estructuras remanentes sean muy poco dependientes del medio. Sus estabilidades no sufren cambios (**Figura 4(I)-20**) ni disminuyen en el medio proamiloidogénico como ocurre en *wt* y *P301L*, aunque sus estructuras son siempre más débiles. Aparecen eventos hipermecanoestables y valores más altos de fuerza a medida que se dificulta la agregación, pero esto es debido al mayor número de moléculas estructuradas registradas ya que el *test no paramétrico de Kruskal-Wallis* indica que no hay diferencias entre las poblaciones. Las bajas F_u de sus barreras mecánicas, independientemente del medio en el que se encuentre, podría estar asociado al carácter intrínseco proagregante del mutante. En principio las estructuras menos estables mecánicamente podrían desaparecer más fácilmente debido a sus menores barreras cinéticas, lo que daría lugar a monómeros competentes amiloides.

La longitud de las estructuras formadas tampoco sufre grandes cambios en función del medio (**Figura 4(I)-21**). Sólo cuando el monómero se ve sometido al tampón proamiloidogénico, se cuantifica una variación significativa en los valores de ΔL_c . El histograma muestra que hay una región no poblada en valores bajos ($\sim 5-18$ nm), lo que origina un diagrama de caja y bigotes visualmente diferente a los dos anteriores. La mediana se descentra de la caja, adquiriendo un valor más alto. Esto se traduce en una preferencia en la formación de estructuras que implican un bajo número de residuos, dejando desordenada gran parte de la molécula y disponible para la interacción con otro monómero. Una explicación alternativa sería que estos monómeros con estructuras más pequeñas fueran confórmeros dirigidos hacia el desplegamiento completo de la proteína.

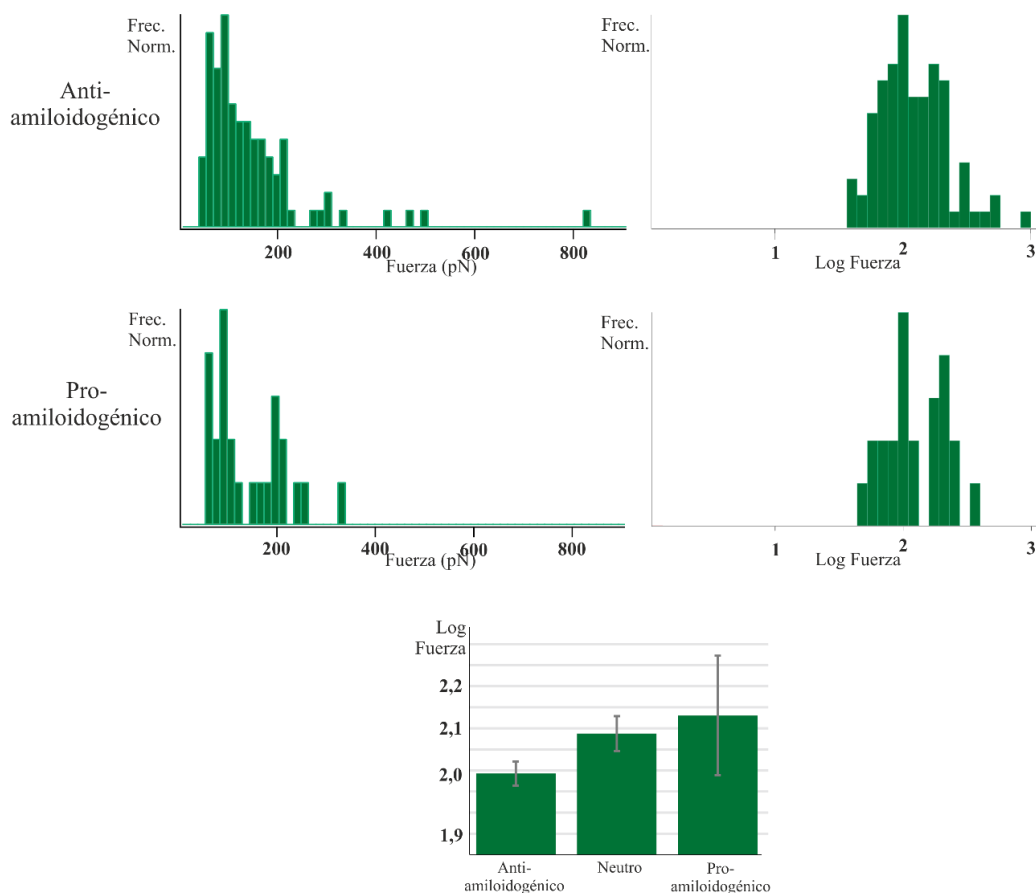


Figura 4(I)-20. Análisis de las estabildades de la primera barrera mecánica en $\Delta 280K$. Las estabildades de las estructuras en $\Delta 280K$ no dependen del medio en el que se encuentre la proteína. Cabe destacar que el alto EEM en la condición proamiloidogénica es debido al bajo porcentaje de moléculas estructuradas en esta condición, que supone un menor número de datos en el análisis.

Los tipos de estructura en $\Delta 280K$ están escasamente condicionados por el medio; sólo el tampón proamiloidogénico provoca una leve tendencia hacia la formación de plegamientos más pequeños

Al contrario de lo que ocurre con el mutante anterior, el carácter de los plegamientos en P301L se ve fuertemente afectado por el entorno químico. Las estabildades de las estructuras aumentan drásticamente en condiciones no aptas para la agregación, pues su mediana $F_u = 169,55$ pN es altamente superior a la registrada

en las demás distribuciones presentes en este estudio. Acorde a esto, los análisis muestran un fuerte descenso de la estabilidad con la propensión a agregar (**Figura 4(I)-22**), existiendo una diferencia de 45 pN entre las medianas de las poblaciones F_u en los tampones anti- y proamiloidogénico. Se intuye que este descenso parece progresivo, aunque el bajo número de moléculas analizadas en los medios neutro y proamiloidogénico (22 y 30, respectivamente) posiblemente impide apreciar las diferencias entre ambas poblaciones.

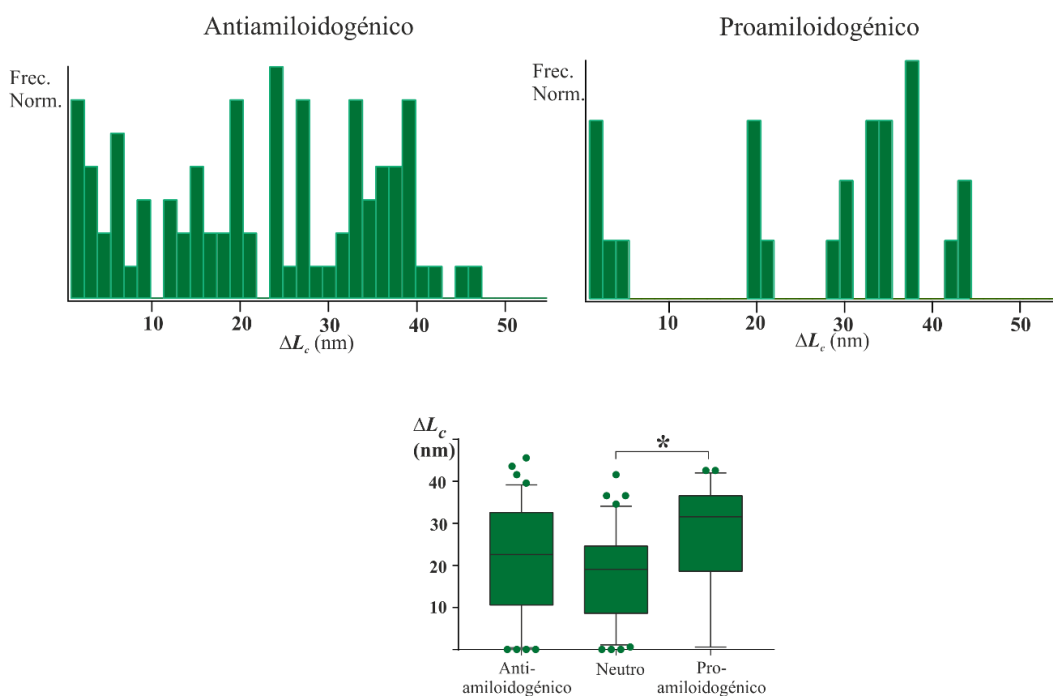


Figura 4(I)-21. Análisis de las longitudes hasta la primera barrera mecánica en $\Delta 280K$. Como ocurre en los casos anteriores, las estructuras formadas pueden abarcar todas las secuencias de la molécula. Sin embargo, se percibe una leve tendencia hacia la formación de estructuras más pequeñas en la condición proamiloidogénica.

Las longitudes de los segmentos estructurados son muy dependientes del medio (**Figura 4(I)-23**). Las condiciones extremas, anti- y proamiloidogénicas, inducen a un tamaño similar de las estructuras formadas. En el medio neutro, el plegamiento tiende a incluir zonas más extensas de la molécula, llegando a no encontrarse pequeñas estructuras que dejarían a la proteína casi desplegada. En cambio, las estructuras remanentes registradas en el medio proamiloidogénico, aunque pueden abarcar toda la extensión y tamaño de la proteína, son preferentemente pequeñas. En general, el medio altera fuertemente las características de las estructuras

formadas en P301L, al igual que también lo hacía con la frecuencia de las moléculas plegadas de la población.

El medio modula fuertemente las estructuras dadas en P301L. Las estructuras remanentes en la condición proamiloidogénica tienden a ser de baja estabilidad y a abarcar secuencias cortas.

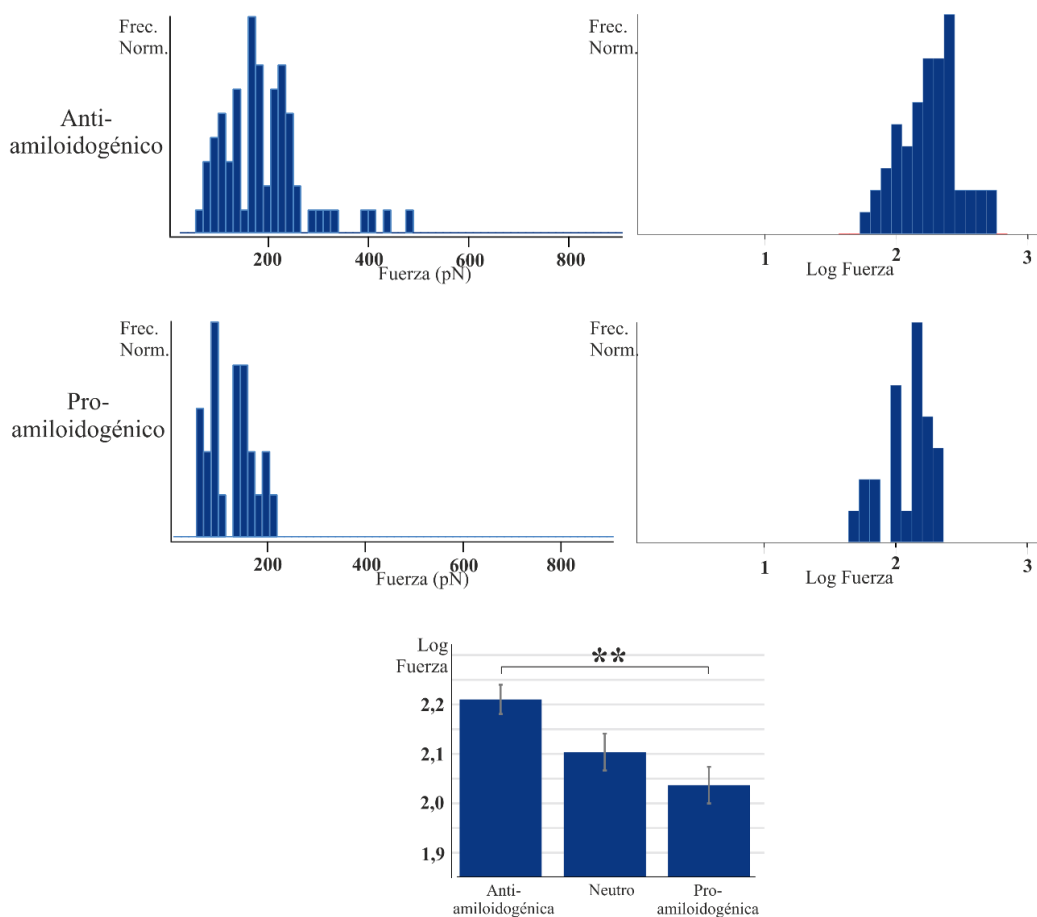


Figura 4(I)-22. Descripción y comparación de los valores de F_u en P301L en función del tampón. Las estructuras se van debilitando con la propensión a agregar del tampón. Los cambios registrados son muy fuertes, mostrando especialmente que una elevada fuerza iónica causa un incremento en la fuerza de las interacciones.

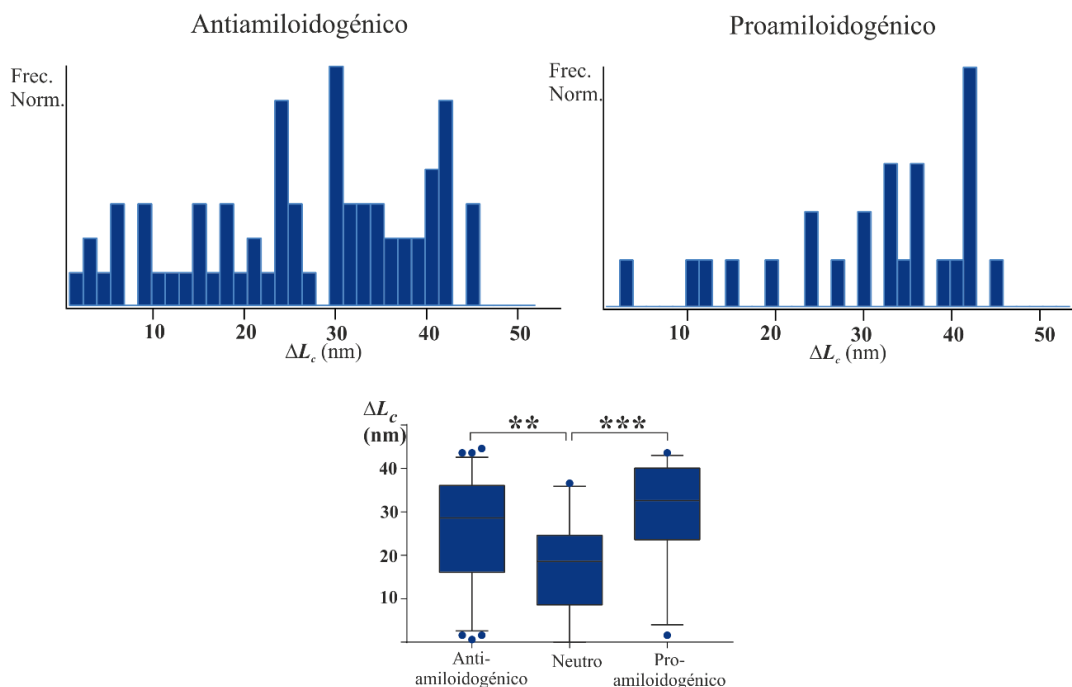


Figura 4(I)-23. Caracterización y comparación de los ΔL_c previos a la primera estructura formada en P301L. Los tamaños de los segmentos que se organizan en P301L son muy dependientes del entorno. Esta proteína cambia de forma pronunciada el tamaño de las estructuras formadas, adquiriendo una preferencia por la formación de estructuras más pequeñas al pasar de las condiciones neutras a las proamiloidogénicas.

En resumen, la ratio de población plegada/desplegada de los mutantes en relación al cambio del tampón, se ve alterado con la misma tendencia que lo hace el *wt*, apoyando de nuevo la idea de que la pérdida de contactos intramoleculares está asociada a la agregación. Sin embargo, la penetrancia de este efecto es diferente para cada mutante. El efecto de la fuerza iónica y pH toma mucha más relevancia en la secuencia de tau con la eliminación de un aminoácido hidrofóbico en la posición 301 (P301L) que con la eliminación de la carga positiva del residuo 280 ($\Delta 280K$).

Por otro lado, también las características de las estructuras intramoleculares se ven afectadas y de diferente manera en cada caso. Las estabilidades en $\Delta 280K$ no sufren variaciones significativas y sus valores se mantienen bajos en las diferentes condiciones experimentales. Esto no ocurre en P301L que, aunque sus estabilidades también son bajas en el medio proamiloidogénico, la mediana de los datos en su distribución asciende en 45 pN en relación a la condición opuesta antiamiloidogénica. Sus longitudes de secuencia participantes en los plegamientos también sufren grandes variaciones, mientras que en $\Delta 280K$ sólo se observan leves cambios. Sin embargo, se

percibe un rasgo común en las dos mutaciones: en el medio proamiloidogénico la distribución de estructuras posibles no abarca toda la longitud de molécula de forma homogénea, sino que hay una tendencia preferencial a formar estructuras cortas, cuyas secuencias no abarcan más de la mitad de la longitud de la molécula.

BLOQUE II

El vector pFS-2 nos ha permitido un análisis nanomecánico inequívoco de tau *wt* y sus mutantes proagregantes $\Delta 280K$ y P301L. Sin embargo, nos hemos encontrado varias dificultades en el análisis. En los eventos mecanoestables, uno o varios picos de fuerza pueden aparecer entremezclados con marcadores de monomolecularidad y a lo largo de todo el espectro, por lo que su identificación resulta ciertamente laboriosa y puede llegar a consumir mucho tiempo. Además, hemos comprobado que identificar el origen de las señales entre marcadores resulta difícil para investigadores inexpertos (sin mucha experiencia en el campo) pues no siempre resulta obvia la adscripción de un pico de fuerza a ruido (y su posterior descarte por provenir de interacciones inespecíficas) o a nuestra proteína de interés (para su inclusión en el análisis).

Para facilitar el estudio de aIDPs por SMFS y acercar esta metodología a un mayor número de investigadores, se decidió desarrollar una estrategia que permitiera su análisis de una forma más simplificada, eficiente e infalible para cualquier persona, incluso no entrenada. Para ello, se decidió buscar una proteína portadora que supusiera un criterio adicional a las ya usadas (ubiquitina e I27) para la selección de registros, y que pudiera ser fácilmente incorporada en cualquier plásmido de uso común en el campo. Basándonos en el hecho de que el desplegamiento de una poliproteína sigue un orden jerárquico de fuerzas crecientes, la nueva estrategia se ideó consiste en el uso de un hospedador con mayor estabilidad mecánica que los marcadores de monomolecularidad (ubiquitina o I27), para conseguir que la señal de la proteína a analizar aparezca en la inmensa mayoría de los casos en la misma localización del registro: al final, lejos de la zona de ruido y con la señal completa de interés unificada. Así se conseguiría que patrones nanomecánicos complejos y polimórficos, como aquellos de las aIDPs, puedan ser analizados de una manera mucho más sencilla y eficiente.

La cohesina c8C como proteína portadora: caracterización teórica y experimental

El portador usado en la estrategia propuesta debe tener una estabilidad mecánica promedio significativamente superior a la de los marcadores de monomolecularidad, que pueden ser repeticiones de ubiquitina o del módulo I27 de la titina cardíaca humana. Para ello, nos centramos en las escafoldinas, en concreto las pertenecientes al celulosoma ya que muchas de ellas muestran estabilidades mecánicas altas. En nuestro laboratorio se habían caracterizado con anterioridad las propiedades mecánicas de tres módulos de cohesina de las escafoldinas CipA y CipC de *Clostridium thermocellum* y

de *C. cellulolyticum*, respectivamente[71]. Las cohesinas c7A y c1C mostraron estabilidades mecánicas inusualmente altas, con fuerzas de desplegamiento de $F_{c7A} = 480 \pm 77$ pN y $F_{c1C} = 425 \pm 53$ pN, mientras que la cohesina c2A mostró una mecanoestabilidad mucho menor, $F_{c2A} = 214 \pm 41$ pN, a una velocidad de estiramiento de 0,4 nm/ms[71]. Sin embargo, c7A y c1C son tan mecanoestables que generan un porcentaje bajo de registros válidos, posiblemente debido a que la estabilidad del anclaje no sea tan alta como su mecanoestabilidad, causando que el desanclaje ocurra antes que el desplegamiento. Por ello, estas proteínas no serían buenas candidatas para ser usadas como portadoras. El hospedador ideal debería tener una estabilidad mecánica entre los 300-400 pN. En este rango su estabilidad sería suficientemente superior a la de los marcadores de monomolecularidad (~200 pN), pero no tan alta como para que los desanclajes prematuros impidan la obtención de registros que contengan el pico de fuerza correspondiente a su desplegamiento.

Con el fin de implementar este nuevo requisito, se exploró la posible existencia de cohesinas cuya estabilidad mecánica oscilara en ese rango. En un reciente estudio de nuestro laboratorio donde se estudiaron nuevas cohesinas[72], tampoco se encontraron estabilidades como las requeridas y, hasta donde nosotros sabemos, no existe ninguna publicación donde se caracterice estructuralmente uno de estos módulos que cubra nuestras necesidades. Es por ello que debíamos buscar de otro modo a nuestro candidato ideal. Dado que la mecanoestabilidad de un módulo cohesina es atribuida normalmente a su parche mecánico, una corta región de estructura beta responsable de la estabilidad del módulo[71], se especuló con la posible existencia de una cohesina cuyo parche mecánico estuviese compuesto por una secuencia de aminoácidos distinta a las previamente estudiadas, y que esa diferencia causara diferencias en su resistencia a la fuerza. Para ello analizamos la secuencia de los módulos de la escafoldina CipC de *C. cellulolyticum*. El alineamiento de las secuencias de cohesina reveló varias sustituciones en el módulo ocho, c8C (**Figura 4(II)-1**). Dado que dichas sustituciones se encontraban concentradas especialmente en la región predicha como parche mecánico, se hipotetizó que c8C podría presentar un comportamiento mecánico distinto. Cabe mencionar que no elegimos el módulo nueve de CipA (c9A) que presenta también una baja identidad de secuencia, por haber sido ya estudiado[71] y presentar una mecanoestabilidad similar a la del c7A.

```

c1C 1 LKVTIVGTAN GKPGD TVVPVTFADVA KMKNVGTCNFYLGVDASLLEVVSVDAGPIVKNAAVNFSS--SASNGTISFL
c2C 1 LKVAVGTAN GKPGD TVVPVTFADV VNVGNVGT CNFYLAYDASLLEVVSVDAGPIVKNAAVNFSS--SASNGTISFL
c3C 1 LKVAVGTAN GKPGD TVVPVTFADVASAGNVGTCNFYLAYDASLLEVVSVDAGPIVKNAAVNFSS--SASNGTISFL
c4C 1 LKVAVGTAE GNVGDTVVPVTFADVASAGNVGTCNFYLAYDASLLEVVSVAAGPIVKNAAVNFSS--SASNGTISFL
c5C 1 LKVAVGTAE GNVGDTVVPVTFADVASAGNVGTCNFYLAYDASLLEVVSVAAGPIVKNAAVNFSS--SASNGTISFL
c6C 1 LKVAVGTAE GNVGDTVVPVTFADVASAGNVGTCNFYLAYDASLLEVVSVAAGPIVKNAAVNFSS--SASNGTISFL
c7C 1 LKVAVGTAS GKAGD TVVPVTFADVA TVGNVGT CNFYVYDTNLLLEVASVTPGSLVTNAAVNFSS--STSNGTISFL
c8C 1 LGVKIASVT GKPGD TVVPVTF LSNVVKSGNVGTCNFYITVDASMLQAVSATAGDITVLNAFVNFSSSINATTTGTTISLL

c1C 76 FLDNTITDELITADGVFANIKFKLKSVAKTTPVTFKDGGAFGDGTMSKIASVTKTNGSVTIDPG 141
c2C 76 FLDNTITDELITADGVFANIKFKLKSVAKTTPVTFKDGGAFGDGTMAKIATVTKTNGSVTIDPG 141
c3C 76 FLDNTITDELITADGVFANIKFKLKSVAAKTTPVTFKDGGAFGDGTMTKIATVTKTNGSVTIDPG 141
c4C 76 FLDNTITDELITADGVFANITFKLKSVAKTTPVTFKDGGAFGDGTMAKIATVTKTNGSVTIDPG 141
c5C 76 FLDNTITDELITADGVFANITFKLKSVAKTTPVTFKDGGAFGDGTMAKIATVTKTNGSVTIDPG 141
c6C 76 FLDNTITDELITADGVFANITFKLKSVAAKTTPVTFKDGGAFGDGTMAKIATVTKTNGSVTIDPG 141
c7C 76 FLDNTITDOLIKTDTGTPAEIKFKLKSVAKTTPVTFKDGGAFGDGTMAKIATVTKTNGSVTIDPG 141
c8C 78 FLDNTITDQLITSDGVVANLTFKVVGTSS--TTPTLAFKAGGAFGNGNMSKISDTITFTNGSAKLN-- 140
    
```

Figura 4(II)-1. Alineamiento de secuencias de los ocho módulos de cohesina de la escafoldina CipC de *C. cellulolyticum*. Las cajas rojas resaltan los residuos que forman parte del parche mecánico, como se identificó previamente[71]. El grado de conservación entre la mayoría de los módulos es muy alta a excepción del módulo ocho, que difiere especialmente en la región del parche mecánico.

Dada la buena correlación entre la estabilidad mecánica obtenida por simulaciones y la medida experimentalmente[71], se decidió estudiar la estabilidad mecánica de c8C por simulaciones computacionales. Dado que no existe estructura de este módulo, fue necesario generarla a través del **modelado por homología**, que se pudo llevar a cabo dado que hay un alto grado de conservación entre los distintos módulos de cohesina. De esta forma, se generó la estructura de c8C partiendo de c1C como molde, ya que se trata de la estructura conocida que presenta mayor identidad (60,7%). La calidad del modelo fue validada al obtener un valor-Z de -0,839, resultado similar al generado para estructuras de tamaño semejante resueltas experimentalmente. A continuación, se realizaron simulaciones de **dinámica molecular (DM) libre** y se seleccionaron seis estructuras independientes que sirvieron como punto de partida para los ensayos de estiramiento por **dinámica molecular guiada** (SMD, de sus siglas en inglés). Las curvas obtenidas fueron muy similares a aquellas originadas por otros módulos de cohesina con una estructura previamente resuelta. La fuerza promedio de desplegamiento para c8C fue 568 ± 86 pN, cuyo valor es intermedio a los valores predichos computacionalmente en las mismas condiciones para las cohesinas con mayor ($F_{C7A} = 710 \pm 120$ pN; $F_{C1C} = 630 \pm 70$ pN) y menor ($F_{C2A} = 630 \pm 70$ pN) mecanoestabilidad.

Estos datos parecen indicar que c8C podría tener la estabilidad mecánica que estábamos buscando. Para corroborarlo, se procedió a caracterizarlo experimentalmente por SMFS. Para ello, se clonó la secuencia codificante de c8C en un vector pAFM[47] obteniéndose una fuerza de desplegamiento promedio de 350 ± 66 pN

(n=119), claramente superior a la fuerza de desplegamiento del marcador de monomolecularidad I27 (**Figura 4(II)-2**).

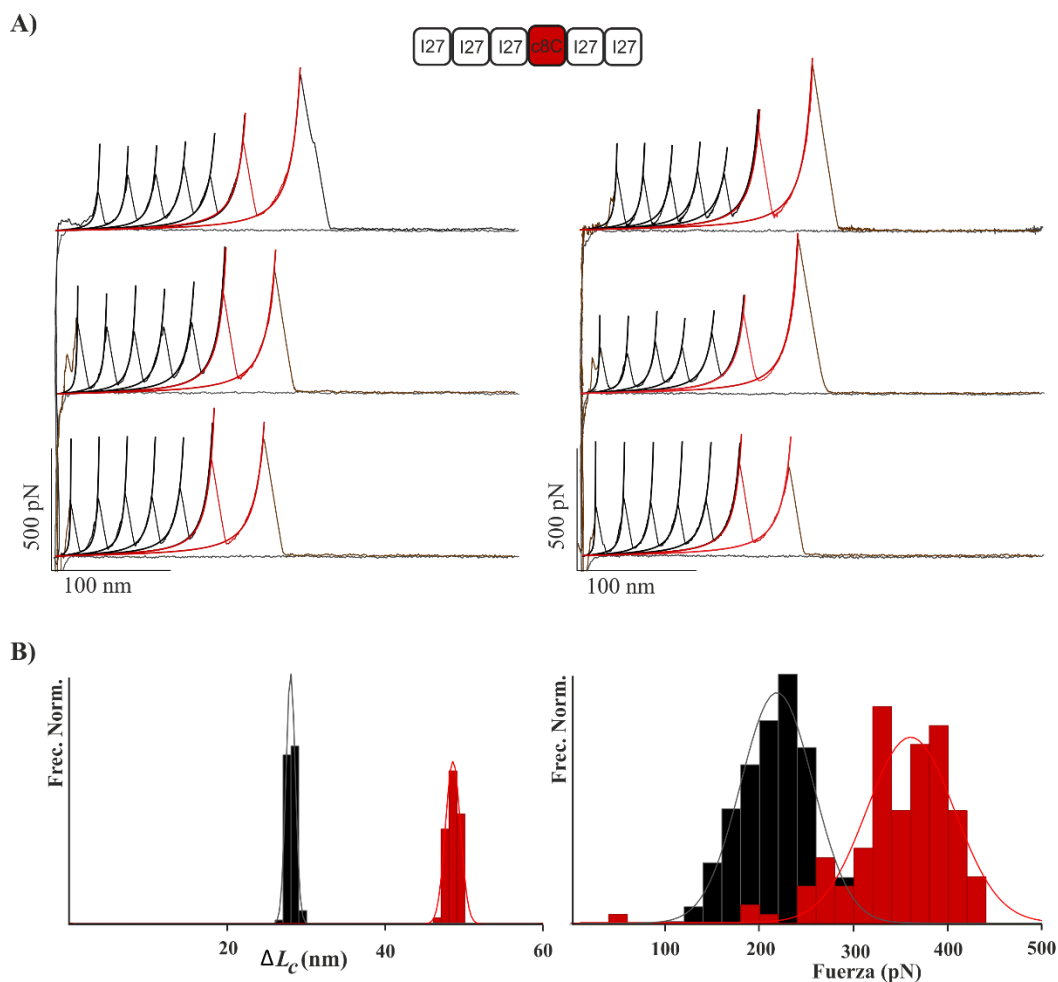


Figura 4(II)-2. Caracterización mecánica de c8C. Las señales y valores de los marcadores de monomolecularidad I27 vienen representados en negro mientras que los de c8C están indicados en rojo. **A)** Esquema de la heteropoliproteína usada para el estudio de c8C por AFM-SMFS y registros típicos obtenidos usando esta estrategia flanqueante. **B)** Izquierda, histograma de las distribuciones de ΔL_c de c8C ($48 \pm 1,3$ nm, $n = 119$) e I27 ($27,5 \pm 0,8$ nm). Derecha, fuerzas de desplegamiento de ambas proteínas y ajuste de sus valores a una distribución gaussiana. Se obtuvieron unos valores de 350 ± 66 pN ($n = 119$) en el caso del módulo c8C y 209 ± 54 pN en el caso de I27.

El siguiente paso consistió en identificar y testar un bucle en la proteína que fuese tolerante a la inserción de un MCS para el clonaje de la proteína de interés. Se estableció que la región más fluctuante sería posiblemente la más adecuada, ya que se

minimizarían los efectos causados por la inserción. Con este fin, se realizaron simulaciones de DM libre para estudiar las fluctuaciones de cada residuo aminoácido, observando que el bucle situado entre las hebras- β 8 y 9 era la región que más fluctuaba. Sin embargo, éste se encuentra muy cerca del parche mecánico de la proteína, por lo que la inserción de una secuencia larga podría desestabilizarla[60]. La siguiente zona que presenta una alta fluctuación es el bucle situado entre las hebras- β 5 y 6 y compuesto por los residuos 59-62, que afortunadamente se encuentra en este caso en la posición opuesta al parche mecánico, lo que lo convertía en un buen candidato. Para testar esta propuesta, generamos de nuevo un modelo c8C-MCS siguiendo los mismos pasos. El valor-Z obtenido fue de -1,4 y el proceso de desplegamiento mecánico obtenido por SMD fue casi idéntico al de c8C (**Figura 4(II)-3**).

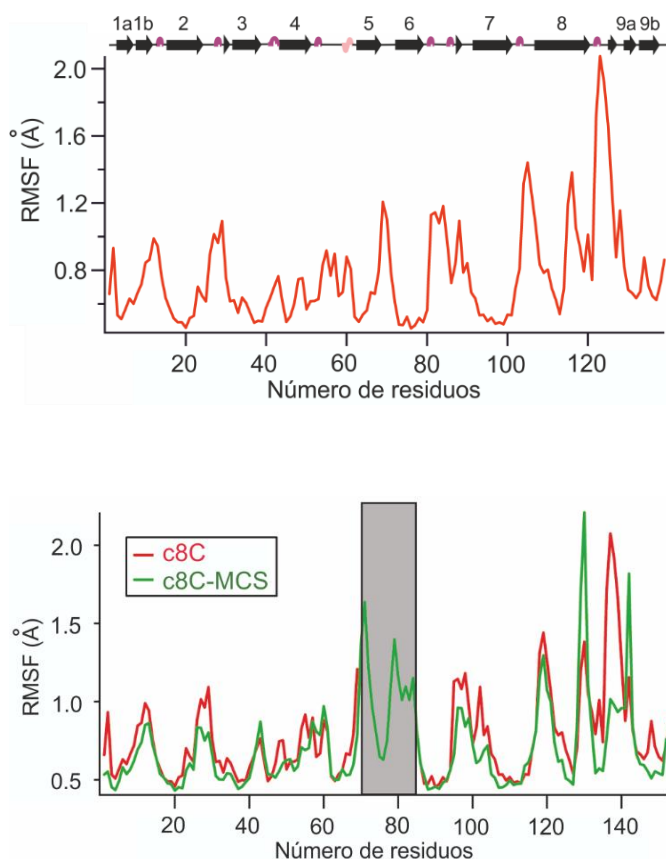


Figura 4(II)-3. RMSF de cada residuo aminoácido de los modelos estructurales de c8C y c8C-MCS durante DM libre. Panel superior) El mapa topológico con la estructura secundaria aparece incluida en la parte superior. Los valores RMSF son más altos en los bucles que en las regiones con estructura secundaria. Próximos a las posiciones 70, 105 y 125 se encuentran los tres picos principales que indican las zonas de mayor movilidad. El bucle entre las hebras- β 5 y 6 fue seleccionado como mejor candidato para insertar el MCS. **Panel inferior)** Comparación de RMSF entre c8C y c8C-MCS, donde la secuencia insertada aparece destacada en una caja gris.

Integridad de c8C cuando actúa como portador mecánico

Como ya hemos enfatizado anteriormente, es esencial que la proteína portadora mantenga su estructura tridimensional y estabilidad mecánica cuando está albergando a la proteína bajo estudio. Consecuentemente, es necesario demostrar que la adición del MCS y las diferentes proteínas a estudiar no alteran significativamente su estabilidad mecánica. Para la validación del nuevo hospedador seleccionamos dos IDPs: (i) una no amiloidogénica, que fue la región citoplasmática de la Proteína de Membrana-2 Asociada a Vesícula (VAMP2, de sus siglas en inglés), componente del complejo SNARE; y (ii) MBD, las cuatro repeticiones del dominio de unión a microtúbulos de la proteína tau, que previamente habíamos estudiado mediante el vector pFS-2. Para realizar los controles estructurales, de nuevo por simplicidad técnica, se escogieron sólo el nuevo portador y las proteínas de fusión (c8C-MCS, c8C-VAMP2 y c8C-MBD), sin los marcadores de monomolecularidad.

Se analizó el contenido general de estructura secundaria de las diferentes construcciones mediante CD en el UV lejano (**Figura 4(II)-4**). c8C mostró el típico espectro de una proteína rica en estructura- β y su variante c8C-MCS generó un espectro casi superponible, indicando que sus estructuras secundarias son prácticamente idénticas. Las IDPs VAMP2 y MBD mostraron la señal típica generada por un ovillo estadístico, con un mínimo pronunciado en 200 nm. En cambio, las proteínas de fusión c8C-VAMP2 y c8C-MBD dieron lugar a unos espectros intermedios entre los generados por la proteína portadora y el huésped aislados, indicando la conservación de la estructura secundaria de c8C tras la inserción de sus IDPs, que permanecen desordenadas.

Para detectar posibles modificaciones en el estado conformacional de c8C al actuar como portador y albergar VAMP2 y MBD, se hicieron experimentos de RMN obteniendo espectros $^1\text{D } ^1\text{H}$ y $^2\text{D } ^1\text{H NOESY}$ y $^2\text{D } ^1\text{H}-^{13}\text{C HSQC}$ (**Figura 4(II)-5**). El nuevo hospedador mantenía las resonancias correspondientes a la proteína sin modificar, incluso cuando se introdujeron las proteínas huésped. Por otra parte, no se observó la aparición de nuevas señales que pudieran indicar interacciones espurias entre las proteínas componentes hospedador-IDP. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos por UV-CD.

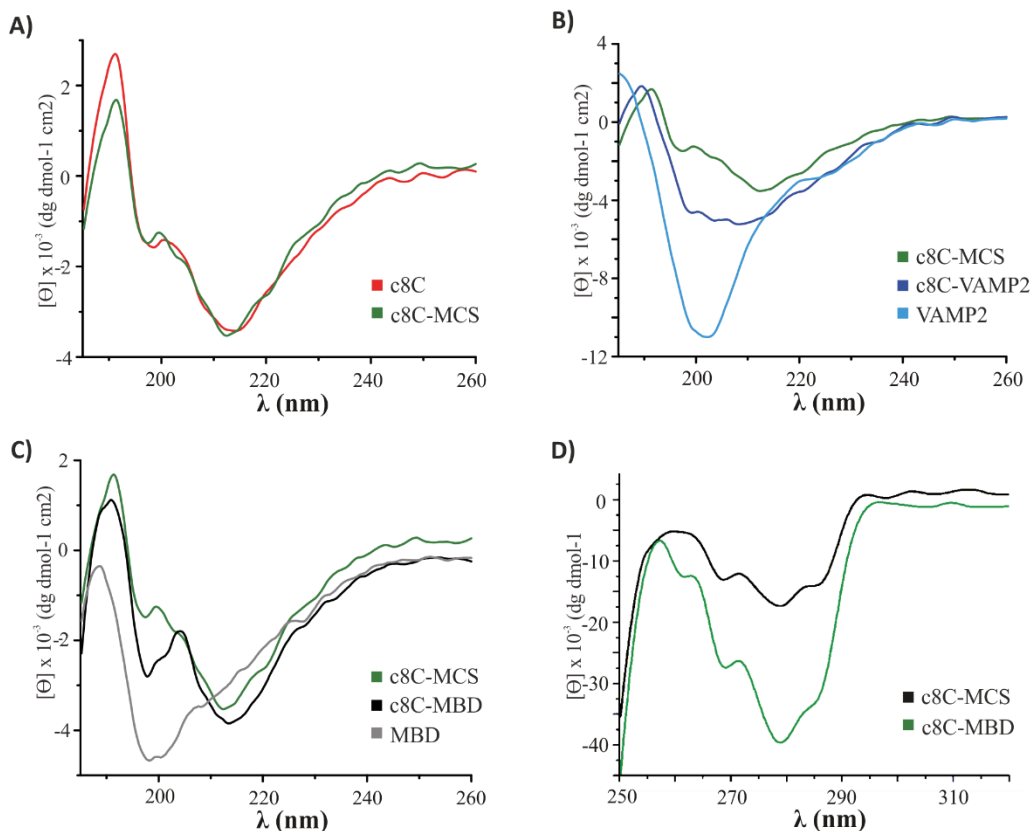


Figura 4(II)-4. Espectroscopía de CD de las construcciones de IDPs basadas en c8C. **A)** Los espectros de c8C con y sin MCS son casi idénticos en el UV-lejano. **B)** y **C)** Los espectros de las proteínas de fusión son aproximadamente equivalentes al promedio teórico de los espectros de c8C-MCS y la IDP hospedada, ponderando el número de residuos de cada componente. Estos espectros son consistentes con que VAMP2 y MBD permanezcan desordenadas mientras que el portador continúe estando plegado tras la inserción. **D)** Los espectros en el UV-cercano revelan el estado plegado de c8C cuando alberga a MBD. La menor intensidad de la señal de c8C en la proteína de fusión es debida al mayor número de residuos en esta construcción.

Para completar la caracterización de nuestro nuevo módulo portador, se analizó su estabilidad térmica antes y después de las inserciones. Al contrario de lo que ocurría con el portador de ubiquitina, la temperatura de desnaturalización de c8C aumenta con la inserción de MCS y las IDPs (**Figura 4(II)-6**). Esto parece indicar que las hebras- β 5 y 6 soportan cierta tensión en el c8C nativo y que la adición de estas regiones provocaría relajación en la zona. Sin embargo, la estabilidad termodinámica sí queda levemente afectada, aunque este cambio no es relevante, especialmente a la temperatura que se realizan los experimentos de SMFS.

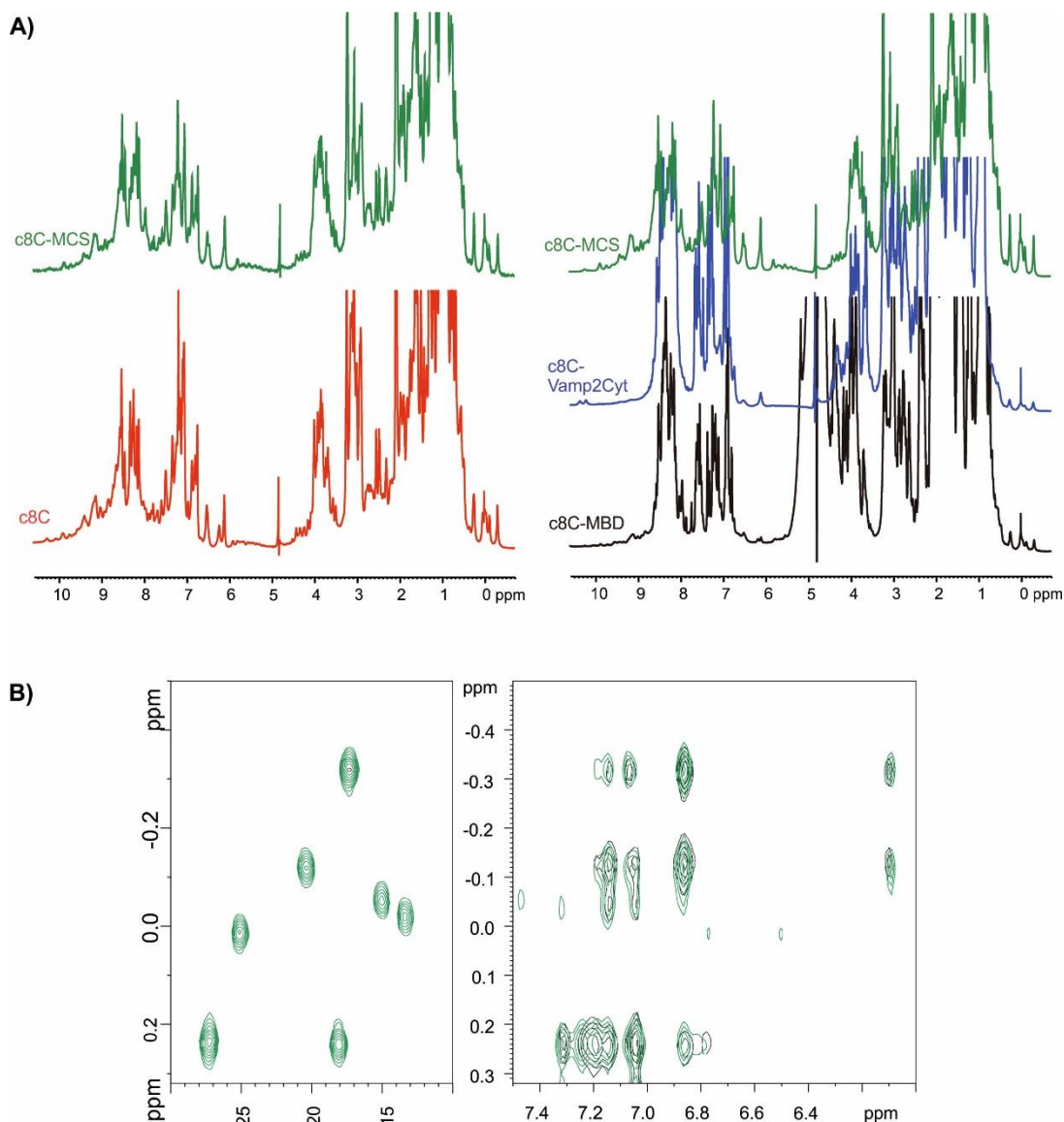


Figura 4(II)-5. Espectros de NMR de las construcciones basadas en c8C. A) Izquierda: ¹D ¹H NMR. El espectro de c8C-MCS es bastante similar al de la proteína plegada c8C, mostrando un fuerte desplazamiento químico típico de las proteínas estructuradas[73] e indicando que no hay diferencias estructurales significativas entre ellas. Las señales en torno a 8,5-8,0, 7,3-7,0 y 0,9 ppm aumentan en tamaño en presencia de los huéspedes, en línea con observaciones previas. Éstos provienen de los hidrógenos de los grupos amida, metilos y aromáticos de proteínas que se encuentran asociados a alguna proteína desordenada[74]. Derecha: las señales de c8C se mantienen con leves desplazamientos tras la inserción de los huéspedes VAMP2 y MBD. Debido a que los desplazamientos químicos ¹H son especialmente sensibles al ambiente local, estos datos muestran evidencias determinantes de que la estructura nativa se mantiene tras la inserción de las IDPs. **B)** Preservación de la integridad de c8C cuando MBD está insertada. Izquierda: espectro 2D ¹H-¹³C HSQC de c8C-MCS registrados a 25°C en abundancia natural.

Las señales que aparecen en esta región pertenecen a los grupos metilo situados sobre los anillos aromáticos de Tyr o Phe en la proteína plegada. Derecha: espectro 2D NOESY ^1H de c8C-MCS (contornos verdes) y c8C-MBD (contornos en negro). El espaciado del contorno es el mismo para ambos espectros, pero el nivel base es seis veces mayor para c8C-MBD, por lo que se refleja una menor concentración de c8C en esta muestra. Se muestra la zona de cruce de picos que provienen de los hidrógenos aromáticos con hidrógenos de los metilos, siendo éstos característicos de c8C plegado. Las señales son prácticamente idénticas en presencia y ausencia de MBD, lo que constituye una fuerte evidencia del estado plegado de c8C cuando alberga MBD.

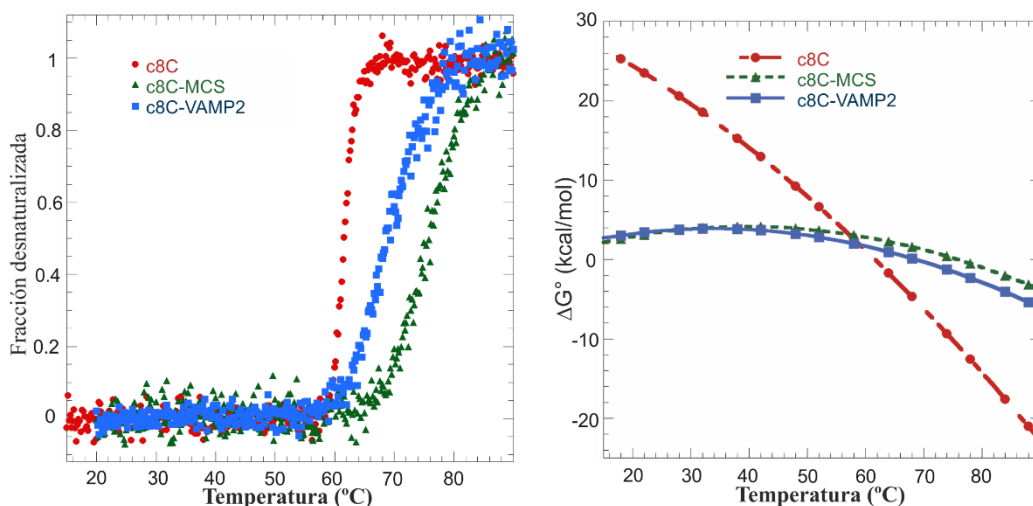


Figura 4(II)-6. Datos de estabilidad térmica del portador c8C. Izquierda) desnaturalización térmica de c8C con el MCS y el hospedador VAMP2, monitorizado por espectroscopía CD. c8C presenta una Tm menor pero una transición más cooperativa. Derecha) a pesar de que c8C-MCS y c8C-VAMP2 tienen una Tm mayor que c8C aislada, su estabilidad conformacional es menor a la temperatura experimental.

Todos estos datos nos permiten concluir que la proteína c8C permanece plegada cuando actúa como portador y que su estructura global se mantiene cuando insertamos proteínas desordenadas amiloidogénicas y no-amiloidogénicas, sin evidencias de interacciones espurias entre el hospedador y el huésped.

Validación del uso de la cohesina c8C como portador mecánico

Finalmente, se procedió a comprobar el potencial de nuestra nueva estrategia mediante experimentos de AFM-SMFS. Los vectores usados para la identificación de moléculas individuales fueron construcciones de poliproteínas basados en la familia de vectores

pFS[36], con ubicuitinas como marcadores de monomolecularidad, y el vector pAFM, que emplea repeticiones de I27[48].

Usando la *modalidad de longitud controlada* en SMFS, se encontró que c8C-MCS en el vector pAFM mostraba una fuerza de desplegamiento $F_u = 368 \pm 28$ pN y un incremento en longitud de contorno de $\Delta L_c = 56,3 \pm 0,8$ nm (n=29), valor que se corresponde con la longitud de la región escondida a la fuerza, considerando 0,4 nm por residuo aminoacídico estirado[35]. Esto indica que la mecanoestabilidad del módulo no se ve afectada tras la inserción del MCS. El incremento de ~5 nm en longitud de contorno es el esperado tras haber incluido los 12 residuos extra del MCS. Además, como se esperaba, el pico de fuerza correspondiente a su desplegamiento, siempre aparece al final de cada registro, hecho que facilita enormemente su identificación y análisis.

Para validar el éxito de la estrategia usando c8C-MCS como nuevo portador para el análisis nanomecánico inequívoco de IDPs en general y aIDPs en particular, se realizaron experimentos de SMFS con las proteínas desordenadas previamente escogidas: VAMP2 (no amiloidogénica) y MBD (amiloidogénica) (**Figura 4(II)-7**). Dado que VAMP2 no forma interacciones intramoleculares, se comporta como un muelle con elasticidad entrópica que no muestra picos de fuerza a nuestra velocidad de estiramiento habitual. Los datos se obtuvieron usando construcciones basadas en los vectores pFS y pAFM. El resultado obtenido fue el mismo que el publicado tras el uso de los portadores ubicuitina e I27[37], aunque en este caso la fuerza del desplegamiento del hospedador no parece quedar afectada significativamente y, como cabe esperar, su señal aparece al final de los registros. El valor de ΔL_c fue 90 nm, que corresponde con la longitud del portador desplegado junto con VAMP2 (~ 51 nm de c8C-MCS con 4 residuos menos por escisión en el clonaje, más 37 nm de la IDP). Este valor es significativamente mayor a la longitud obtenida tras el desplegamiento de los hospedadores previos, rasgo que ayuda a la rápida identificación de c8C en el registro.

Finalmente, el último paso consistió en aplicar la nueva estrategia a la proteína neurotóxica amiloidogénica objeto de la presente tesis doctoral: tau. La región escogida fue MBD, exactamente la misma que hemos analizado previamente con el vector pFS-2. Al igual que lo mostrado en el Bloque I, MBD de tau humana se encontró en los estados NM y M, pudiendo presentar varios picos de fuerza tras el estiramiento. No se encontró ninguno de estos picos entremezclados con aquellos provenientes de los marcadores. Por lo tanto, lo que finalmente hemos conseguido es que todos estos picos aparezcan unificados y siempre en el mismo lugar (al final del registro y tras el reportero c8C). Esto permitió identificar los registros válidos casi inmediatamente (sin

necesidad de un arduo análisis previo) y agilizar enormemente la asignación de los diferentes picos de fuerza (Figura 4(II)-7C y 4(II)-8).

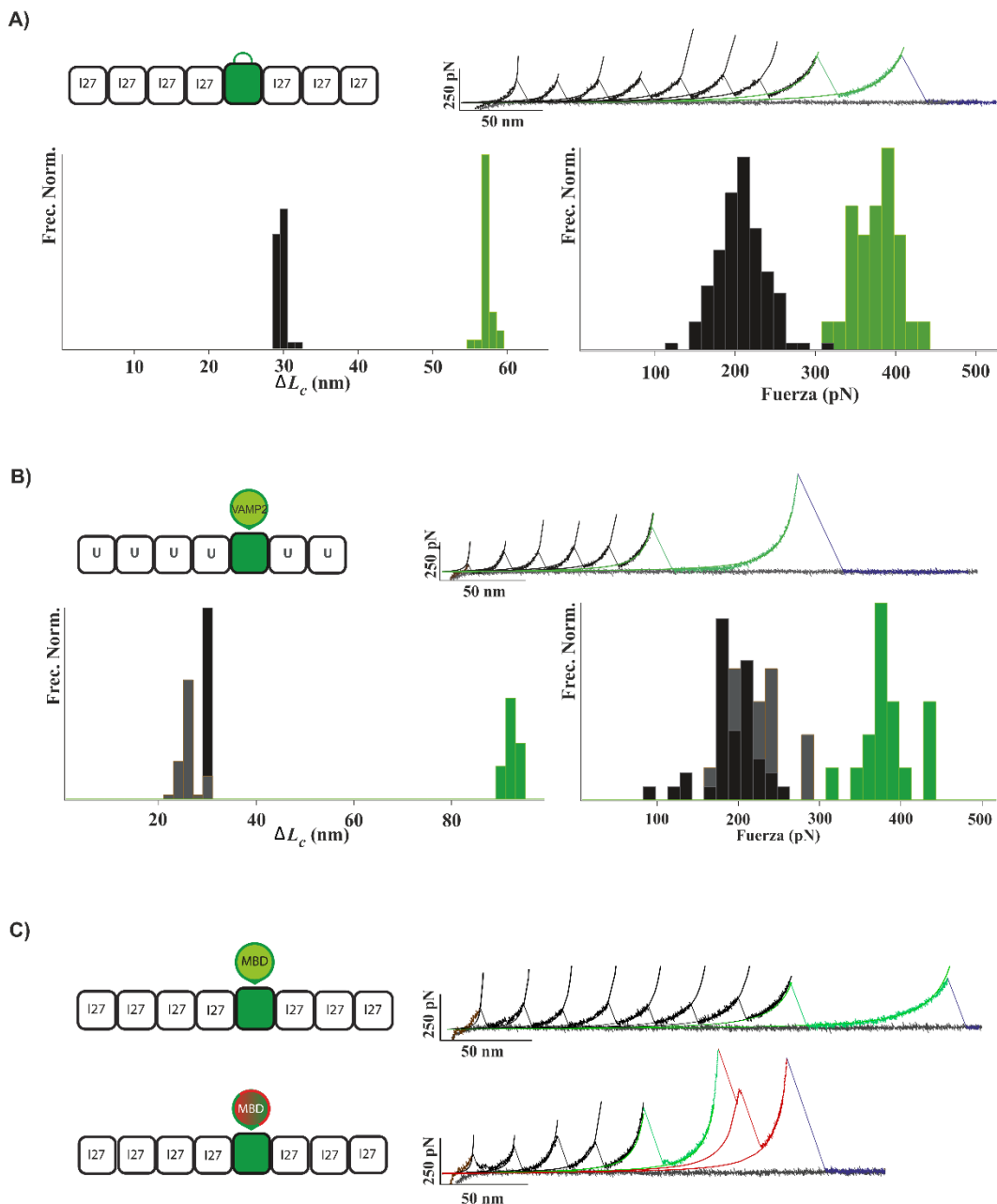


Figura 4(II)-7. Análisis por SMFS de proteínas hospedador-huésped basadas en c8C. Se muestran los esquemas de las poliproteínas usadas en cada caso en la zona superior de los registros. **A)** Distribución de fuerzas de desplegamiento e incrementos en longitud de contorno

de los módulos de pAFM-c8C-MCS. En negro, aparecen los valores correspondientes a los marcadores de monomolecularidad I27, obteniendo una fuerza de desplegamiento de 199 ± 31 pN y un $\Delta L_c = 29,0 \pm 0,5$ nm ($n = 117$). Los datos de c8C-MCS se representan en verde, y los valores obtenidos son $F_u = 367 \pm 28$ pN y $\Delta L_c = 56,3 \pm 0,8$ nm ($n = 27$). **B)** Distribuciones de c8C-VAMP2 en los vectores pFS y pAFM. Los registros de VAMP2 muestran eventos no mecanoestables ($n=17$) y una fuerza de desplegamiento promedio de su portador de 375 ± 33 pN. En gris y en negro, las distribuciones de fuerza de ubiquitina e I27 muestran unos valores de 182 ± 33 pN y 214 ± 32 pN, respectivamente. Los valores de ΔL_c son $90,9 \pm 0,99$ nm para c8C-VAMP2, $24,8 \pm 1,9$ nm para la ubiquitina y $28,4 \pm 0,3$ nm para el I27. **C)** Dos registros representativos de la poliproteína pAFM-c8C-MBD revelan la presencia de estructuras no mecanoestables (izquierda) y mecanoestables (derecha), tal y como se encontró con el uso del vector pFS-2. Al final del registro, se puede identificar la ruptura de dos estructuras mecanoestables distintas de un único confórmero.

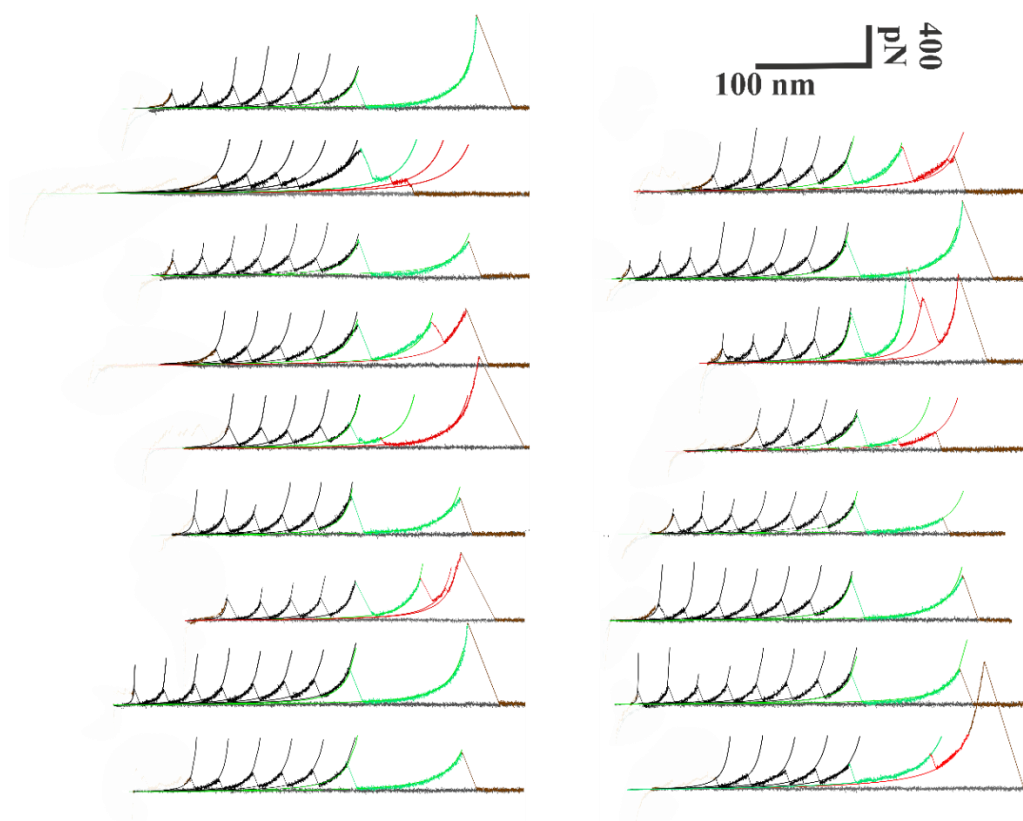


Figura 4(II)-8. Registros SMFS de tau con la estrategia c8C y marcadores monomoleculares de ubiquitina. 17 curvas fuerza-extensión muestran el éxito de la estrategia. Todas las curvas generan el mismo patrón, con la aparición de los picos de fuerza provenientes de nuestra proteína problema al final del registro. Independientemente del polimorfismo, todos los picos de fuerza son fácilmente identificables tras el pico de fuerza característico del portador mecánico c8C, que actúa de protector mecánico y reportero que anuncia la señal de la proteína problema.

Esta nueva estrategia se presenta como la herramienta óptima para el análisis de aIDPs por SMFS. La identificación de los registros válidos y de la señal de interés se realiza de manera inequívoca y casi instantánea debido a que: i) ésta se encuentra siempre en la misma posición en el registro, al final; ii) su aparición viene indicada por un pico de fuerza claramente superior en intensidad al patrón repetitivo del marcador de monomolecularidad; iii) la señal siempre aparece unificada y iv) se obvia la posible presencia de ruido que pudiera generar confusión sobre el origen de la señal a analizar (**Figura 4(II)-9**). De este modo, esta estrategia no sólo se convierte en una herramienta para un análisis más sencillo y eficiente de aIDPs, sino que permite el análisis de estas proteínas a investigadores no expertos en el campo de una forma sencilla.

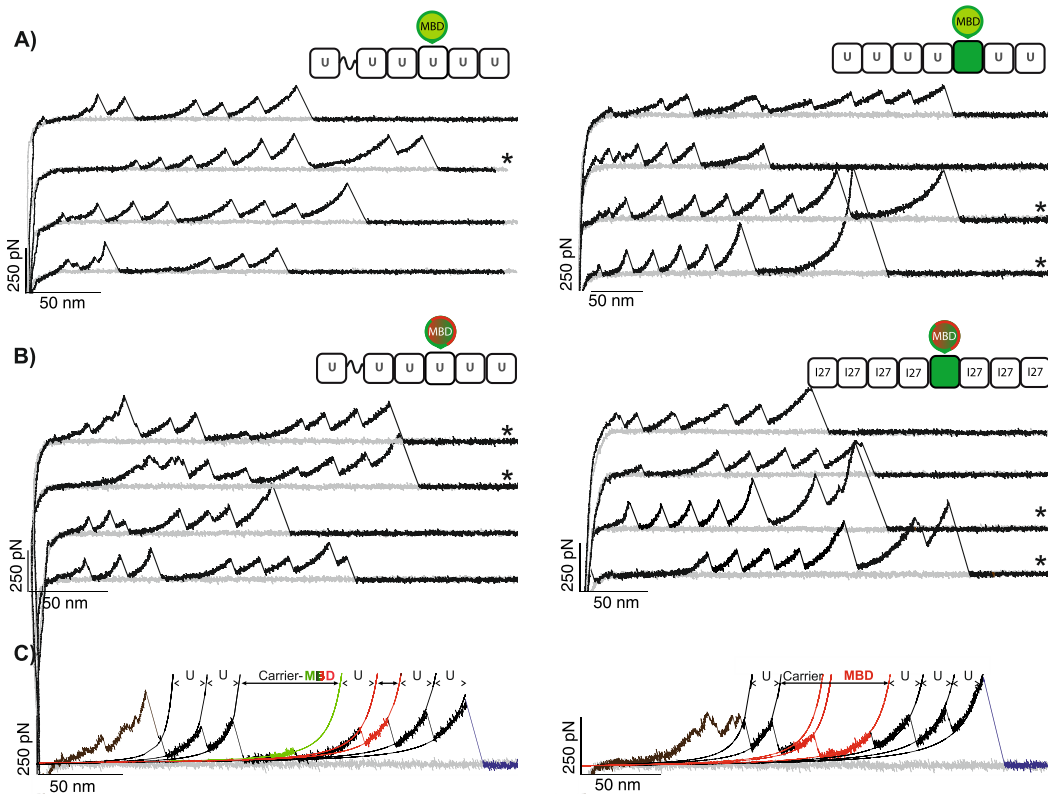


Figura 4(II)-9. Comparación de los registros obtenidos por SMFS al analizar MBD con el vector pFS-2 y la estrategia del portador c8C. Los registros pertenecientes al mismo experimento están agrupados en bloques. El asterisco (*) señala los registros válidos. **A)** Conformeros no-mecanoestables. Izquierda: el vector pFS-2 muestra el comportamiento no-mecanoestable de MBD; sin embargo, para seleccionar el registro válido, deben medirse todos los ΔL_c asociados a cada pico de fuerza. Distancias mayores entre los picos de fuerza podrían originarse no sólo por el desplegamiento del hospedador-MBD sino también por un desplegamiento incompleto de MBD, la presencia de contaminantes o incluso interacciones artefactuales entre cualquiera de los elementos del sistema. Derecha: el uso de c8C como portador ofrece una ayuda visual para

la selección inmediata de los registros. La mayoría de ellos se confirman como válidos tras medir el ΔL_c posterior al mayor pico de fuerza. **B)** Confórmeros mecanoestables. Izquierda: la identificación de los eventos mecanoestables es especialmente engorrosa en el vector pFS-2; se deben identificar y sumar aquellos ΔL_c s que no se correspondan con el desplegamiento de las ubicuitinas. El registro sería válido si el valor de esta suma coincide con la longitud total del hospedador-MBD tras ser desplegado. Derecha: Sin embargo, con la nueva estrategia la identificación del portador se hace mediante la presencia de un pico de fuerza al final del registro cuya magnitud es más alta que la de los marcadores de monomolecularidad, al que le sigue el desplegamiento de MBD. No se espera la adición de ningún otro elemento. **C)** Análisis nanomecánico detallado de los registros seleccionados (*) usando el vector pFS-2 (panel B, izquierda). Izquierda: se observan dos marcadores de monomolecularidad seguidos del despliegue del hospedador más una región desordenada de MBD; sin embargo, un marcador aparece entremezclado, pues se ha desplegado antes que la parte estructurada de MBD. Finalmente, dos marcadores adicionales se despliegan antes del desanclaje de la molécula. Derecha: al desplegamiento de un marcador ubicuitina le sigue el de la ubicuitina portadora y dos estructuras de MBD; a continuación, y antes del desanclaje de la proteína, se observan los picos correspondientes a tres marcadores adicionales.

Parte V

DISCUSIÓN

Las taupatías son un grupo numeroso de desórdenes neurodegenerativos caracterizados por la agregación patológica de tau. Esto ha motivado que el estudio de su amiloidogénesis haya despertado el interés en tau de cientos de grupos de investigación alrededor de todo el mundo. A pesar de toda la información que ha conseguido obtener acerca de la proteína, todavía no se han identificado las características dinámicas conformacionales que le confieren ese comportamiento. Esto es debido a la dificultad que suponen tanto su tendencia a oligomerizar y agregar como las limitaciones metodológicas para registrar conformaciones heterogéneas de aIDPs a nivel de molécula individual.

Las técnicas de molécula individual permiten abordar estas preguntas, pero al encontrarnos ante un sistema muy complejo, la estrategia a seguir y el método de análisis son elementos clave para asegurar el éxito de la investigación. Como hemos comprobado, la estrategia de la proteína portadora presente en el vector pFS-2, permite obtener información crucial e inequívoca de aIDPs. Los rigurosos criterios de selección de registros válidos han sido explicados en la sección de “Materiales y Métodos”. Sin embargo, no se ha fijado un número mínimo de marcadores como criterio basado en la geometría, típico de proteínas plegadas, ya que sesgaría la distribución en la estructuración del monómero. Hemos observado empíricamente que la probabilidad de obtener registros donde se ha desplegado completamente la poliproteína (registros *full-length*) está inversamente relacionada con la mecanoestabilidad del evento. En los registros *full-length* la aIDP bajo estudio tiende a comportarse como un ovillo estadístico, mientras que los eventos mecanoestables tienden a tener un menor número de marcadores de monomolecularidad. Esto sugiere que el evento mecanoestable, de algún modo, tiende a afectar a la mecanoestabilidad del anclaje de la poliproteína provocando un desanclaje prematuro. Quizás la ruptura de la interacción intramolecular cause un efecto en el estirado de la proteína completa. Esto queda ejemplificado en la **Figura 4(II)-7**, donde los eventos mecanoestables no aparecen con más de cuatro I27 marcadores de monomolecularidad, mientras que las curvas de los eventos no-mecanoestables tienden a presentar un mayor número de módulos I27. De todas formas, la estrategia de la proteína portadora nos asegura que nuestra proteína bajo estudio está siendo desplegada siempre con la geometría esperada, dirección de estiramiento N-C. Esto se debe a que primero debe ocurrir el desplegamiento del

hospedador e, inevitablemente, lo que se encuentre en su interior va a ser desplegado en esa dirección. Si la longitud de desplegamiento del hospedador más nuestra proteína coincide con la longitud esperada completa, podemos estar seguros que el estiramiento se ha realizado con la geometría correcta.

Así, mediante el pFS-2 y con los criterios indicados, se han estudiado las NPs poliQs, α -sinucleína y $A\beta$, demostrando que el uso de estrategias estándar había conducido a conclusiones erróneas acerca del polimorfismo que adoptaban. En este trabajo, su uso para el análisis nanomecánico de tau ha permitido mostrar que esta proteína presenta un **polimorfismo conformacional similar** al de las anteriores NPs anteriormente estudiadas con este vector, aunque un análisis más profundo de los datos y más experimentos podrían arrojar aún más luz sobre los mecanismos comunes/diferentes de la amiloidogénesis entre NPs. Por ejemplo, el hecho de que el porcentaje de M de tau sea del 51%, muy cercano al de α -sinucleína (55,1%) pero bastante distante del mutante más tóxico de poliglutaminas, Q₆₂ (7,5%), podría ser indicativo de diferencias en procesos o rasgos subyacentes entre ellas. Además, podría estudiarse la respuesta conformacional de las NPs previas ante diferentes medios, tal y como se ha realizado en el presente trabajo. Tras un análisis similar, conseguiríamos unificar observaciones, lo que posiblemente nos aportaría herramientas para ir avanzando en el descubrimiento de los diferentes mecanismos de agregación.

Por otro lado, nuestros resultados contrastan fuertemente con los datos obtenidos usando una estrategia estándar para proteínas plegadas consistente en flanquear tau con módulos de I27, donde los autores concluyen la existencia de tres conformeros preferenciales en el monómero de tau [75]. Sin embargo, en ese trabajo la identificación de picos de fuerza es altamente subjetiva por lo que las conclusiones derivadas de los datos pueden ser erróneas.

En el presente trabajo, no sólo hemos registrado el polimorfismo conformacional de tau y sus mutantes, sino que se han recogido datos que muestran su mecanismo de agregación patológica. Al contrario de lo que en principio podría esperarse en base al comportamiento de NPs previamente analizadas en nuestro laboratorio[37], los mutantes proagregantes causantes de patología familiar muestran un polimorfismo conformacional menor, traducido en un mayor número de moléculas en ovillo estadístico que el *wt*. Ese es el primer dato que nos evidencia un **comportamiento diferente** de tau con respecto a las demás NPs estudiadas hasta la fecha.

Por otro lado, a excepción del $A\beta$, la agregación del resto de proteínas amiloides que se han testado (incluido el prionoide funcional Orb2), pueden ser inhibidas por el

péptido QBP1. El proceso de amiloidogénesis parece comenzar con una modulación en el comportamiento del monómero, inhibiendo el cambio conformacional que daría lugar a un conformero que actuaría como núcleo en el desencadenamiento de la amiloidogénesis. Este péptido no tiene efecto sobre tau, lo que podría deberse a dos razones. Dado que QBP1 fue desarrollado específicamente para inhibir poliglutaminas, tau podría no poseer las características fisicoquímicas necesarias para la interacción y posterior inhibición amiloidogénica. Una explicación alternativa sería que la agregación de tau no pasa por la formación de ese núcleo monomérico rico en estructura- β , por lo que, aunque el monómero de tau abarque un gran número de conformaciones, la aparición de esta estructura estaría muy poco favorecida. Esto se traduciría en un efecto nulo de QBP1 en la agregación y ninguna modulación o casi imperceptible en el polimorfismo del monómero (**Figura 5-1**). De este modo, QBP1 afectaría a las proteínas que siguen una amiloidogénesis por el mecanismo de “crecimiento por nucleación”, mientras que tau seguiría la ruta de la **“conversión conformacional nucleada”**. De hecho, se ha propuesto que la agregación amiloide de una proteína puede darse por diferentes rutas que compiten entre sí, y que por modulación externa (cambios en el medio) se puede dirigir la amiloidogénesis hacia una vía u otra[76]. Basándonos en esto y para explicar la ausencia de efecto de QBP1, se podría intentar modular la agregación de tau forzándola hacia el crecimiento por nucleación y comprobar si bajo esas condiciones este péptido antiamiloidogénico funciona también con tau.

En base a datos experimentales y computacionales, ya se había propuesto en la literatura que tau utilizase el mecanismo denominado de “conversión conformacional nucleada” para su agregación amiloide[77]. Experimentalmente, se consiguió diferenciar un cambio conformacional de **“compacto” a “extendido”** tras la adición del inductor de la agregación heparina. Sin embargo, con los datos aportados, no se puede concluir si este cambio precede a la formación de intermedios solubles de agregación o es posterior; sólo se puede afirmar que este cambio conformacional y la aparición de estructuras solubles son eventos tempranos y **en ruta hacia la formación de fibras amiloides**. Lo que en ese estudio llaman “compacto” es lo que en esta tesis equivaldría a “mecanoestable”, pues son las interacciones intramoleculares las que dan una conformación compacta al monómero. Se puntualiza que el estado compacto contiene muchas conformaciones alrededor del primer hexapéptido hidrofóbico, algo que iría acorde con el polimorfismo conformacional que nosotros observamos. De la misma manera, la conformación “extendida” equivaldría a “No-Mecanoestable” en nuestro estudio, lo que asociamos a un comportamiento de ovillo estadístico donde la molécula se encuentra desplegada, extendida. Con los datos obtenidos mediante nuestra

metodología, en la que sólo registramos moléculas individuales aisladas, es decir, justo al inicio de la cascada de agregación, **podemos afirmar que este cambio conformacional sí precede a la formación de intermedios solubles, y que es el primer paso que llevará a la nucleación.** Esto también coincide con los resultados computacionales de MD del fragmento de tau 273-280, que incluye el primer hexapéptido presente en la segunda repetición, y su mutante $\Delta 280K$ [78]. Sus resultados muestran una conformación expandida del péptido soluble tras la adición de heparina y cuando se encuentra formando un dímero. En condiciones neutras, tanto el mutante como *wt*, son capaces de muestrear un gran conjunto de conformaciones, pero es el *wt* quien tiene preferencia por adoptar conformaciones más compactas, mientras que, en la variante que contiene la delección de la lisina, la molécula tiende a formar conformaciones más extendidas (mayor porcentaje de NM e ΔL_c mayores antes de la primera barrera mecánica. Por tanto, nuestros datos son coherentes con estos otros resultados.

Un rasgo adicional que ha podido observarse es que tau y sus mutantes también presentan **confórmeros hipermecanoestables**, al igual que las otras proteínas neurotóxicas previamente analizadas. Según la originaria **hipótesis mecánica**, estos confórmeros de mecanoestabilidad extremadamente alta podrían ser los causantes de citotoxicidad[37]: provocarían un bloqueo o ralentización en el procesamiento proteico por el proteasoma, generando un incremento en la concentración de monómeros y favoreciendo la interacción entre ellos, lo que desencadenaría la cascada amiloidogénica. Sin embargo, los mutantes de tau no presentan una mayor proporción de estos confórmeros y la condición proagregantes tampoco favorece su formación, sino todo lo contrario: hay una preferencia en la aparición de estructuras de baja mecanoestabilidad. Este resultado nos indica una vez más que tau no sigue la anterior vía amiloidogénica propuesta ni tiene ese mecanismo de acción citotóxica. Sin embargo, hemos de puntualizar que la hipótesis mecánica ha sido revisado recientemente teniendo en cuenta que la geometría de estiramiento del proteasoma es bastante distinta a la utilizada en los experimentos de AFM-SMFS[79].

En cualquier caso, dado que en la ruta del “crecimiento por nucleación” propuesta para explicar el mecanismo de amiloidogénesis de tau, el cambio conformacional ocurriría en el oligómero fundido, este complejo y reorganizaciones posteriores podrían constituir las especies que adquirirían las estructuras estables causantes del bloqueo proteasomal. Más aún, al tratarse de especies con mayor masa molecular, el bloqueo podría ser mayor, causando un efecto citotóxico aún más severo. En el caso de tau, dado que existe un amplio consenso acerca de que la nucleación viene dada por el dímero de tau[80], sería este dímero β -estructurado el que haría este

colapso y provocaría el desbalance en la proteostasis. Futuras simulaciones de formación de dímeros y SMD en el modo de estiramiento proteasomal [79] podrían arrojar luz sobre esta cuestión.

El bloqueo del proteasoma de la hipótesis mecánica explica el aumento de monómeros en el entorno celular, propiciando así el encuentro e interacción entre ellos. Sin embargo, los monómeros de tau no causarían este bloqueo, por lo que el aumento de concentración que llevaría a la **nucleación** no puede explicarse de esta manera. Sin embargo, la concentración de tau aumenta en el espacio celular cuando ésta resulta **hiperfosforilada** y deja de interactuar con los microtúbulos. Por otra parte, tau es una proteína capaz de formar **LLPS** *in vitro*[25] y en neuronas[81], y en estos orgánulos sin membrana hay una mayor concentración de la proteína que los forman.

El alto número de interacciones intramoleculares registradas en este estudio de tau *wt* explicaría la red de interacciones heterogéneas que MBD es capaz de formar, tanto consigo misma como, posiblemente, con otras moléculas de tau cercanas en la LLPS. El monómero estaría en un equilibrio dinámico que pasaría por distintos grados de compactación y que provocaría el enmarañamiento que da dinamismo a la LLPS y previene de la transición al estado amiloide. Por ello, los ensayos de agregación de tau *in vitro* deben hacerse en presencia de un agente reductor (DTT o TCEP). De esta forma se evita la formación del enlace disulfuro intramolecular entre la C291 de la segunda repetición y la C322 de la tercera, que causa la formación de un monómero compacto que inhibe su capacidad de fibrilar[53]. Los residuos básicos de MBD son posiblemente los causantes del polimorfismo conformacional en un medio neutro, y su neutralización con moléculas negativas podría facilitar la interacción intermolecular al producir una expansión de la molécula y quedar los motivos ²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ y ³⁰⁶VQIVYK³¹¹ expuestos al solvente. Una neutralización leve, causaría la formación de LLPS; una neutralización severa (como la conseguida en nuestra condición experimental “pro-amiloidogénica”) haría que estos péptidos hidrofóbicos tiendan a interactuar con los péptidos de otras moléculas también extendidas, llevando a un apiñamiento molecular y posterior formación amiloide. En concordancia con esto, tau *wt* necesita ser fosforilada para la formación de LLPS, mientras que los mutantes proagregantes Δ 280K y P301L, cuyas moléculas están más desestructuradas, y uno de ellos tiene una carga positiva menos, no precisan fosforilación[81]. Apoyando esto, la heparina, que causa la expansión del monómero de tau *wt* y Δ 280K[77], es un cofactor para la agregación amiloide, al igual que el ARN, poseyendo ambas moléculas carga negativa. Del mismo modo, estos dos cofactores originan la formación de LLPS sin necesidad de agentes de apiñamiento molecular. Esto también explica el papel de la

hiperfosforilación en tau en condiciones patológicas, que no sólo provocaría la agregación de tau por la desunión a los microtúbulos sino porque le conduciría a un estado extendido y preparado para establecer interacciones intermoleculares (**Figura 5-1**).

Por otra parte, las **estructuras remanentes** dadas en los **confórmeros** no completamente desplegados podrían jugar un **papel en la formación de distintas estructuras amiloides**. El hecho de que tau forme agregados con diferentes morfologías se ha asociado a las diversas patologías y síntomas asociados a las taupatías, algo que concuerda con el hecho de que distintas especies oligoméricas de proteínas neurotóxicas como α -sinucleína[82] y A β [83] muestren distintas toxicidades. Además, se ha demostrado que agregados de tau con morfologías determinadas pueden propagarse indefinidamente[84]. La existencia de conformaciones que se transmiten o “cepas” son un rasgo típico de priones, y se diferencian entre sí por características como sus cinéticas de agregación y transmisibilidad, lesiones histopatológicas generadas o las áreas neuronales que afectan. Hay **factores de riesgo** como los aquí utilizados (ciertas condiciones del entorno o mutaciones) que causan o exacerbaban la amiloidogénesis de tau. En base a nuestros resultados, esta modulación ocurre a través de un cambio de conformación del monómero hacia un estado desplegado, explorando un alto número de conformaciones durante el proceso. Entre ellas podrían encontrarse **varios estados competentes amiloides que darían lugar a diferentes núcleos con diferentes morfologías, o cepas**, que generarían los distintos tipos de fibras. De este modo, la formación de las cepas vendría ya condicionada desde el monómero. Además, nuestros resultados indican que en torno a un cuarto de la población de las moléculas tanto de tau *wt* como de $\Delta 280K$ y P301L puede ser modulada en su plegamiento, desplazando el equilibrio ordenado/desordenado y adquiriendo estructuras que abarcan toda la secuencia. La diferencia entre ellos radica en **cómo responden a los diferentes entornos**. Por ejemplo, la secuencia silvestre es la que permanece más estable ante los cambios del tampón, lo que podría extrapolarse como una menor sensibilidad a factores de riesgo y explicando su menor carácter amiloidogénico y tóxico. Esta diversidad en la respuesta concordaría con la heterogeneidad de los agregados que se encuentran en las taupatías, lo que estaría asociado a sus diferencias patológicas y sintomáticas[85]. Entender el origen y las diferentes características de los depósitos amiloides es otro punto crítico a la hora de investigar y conseguir tratar la toxicidad por esta proteína.

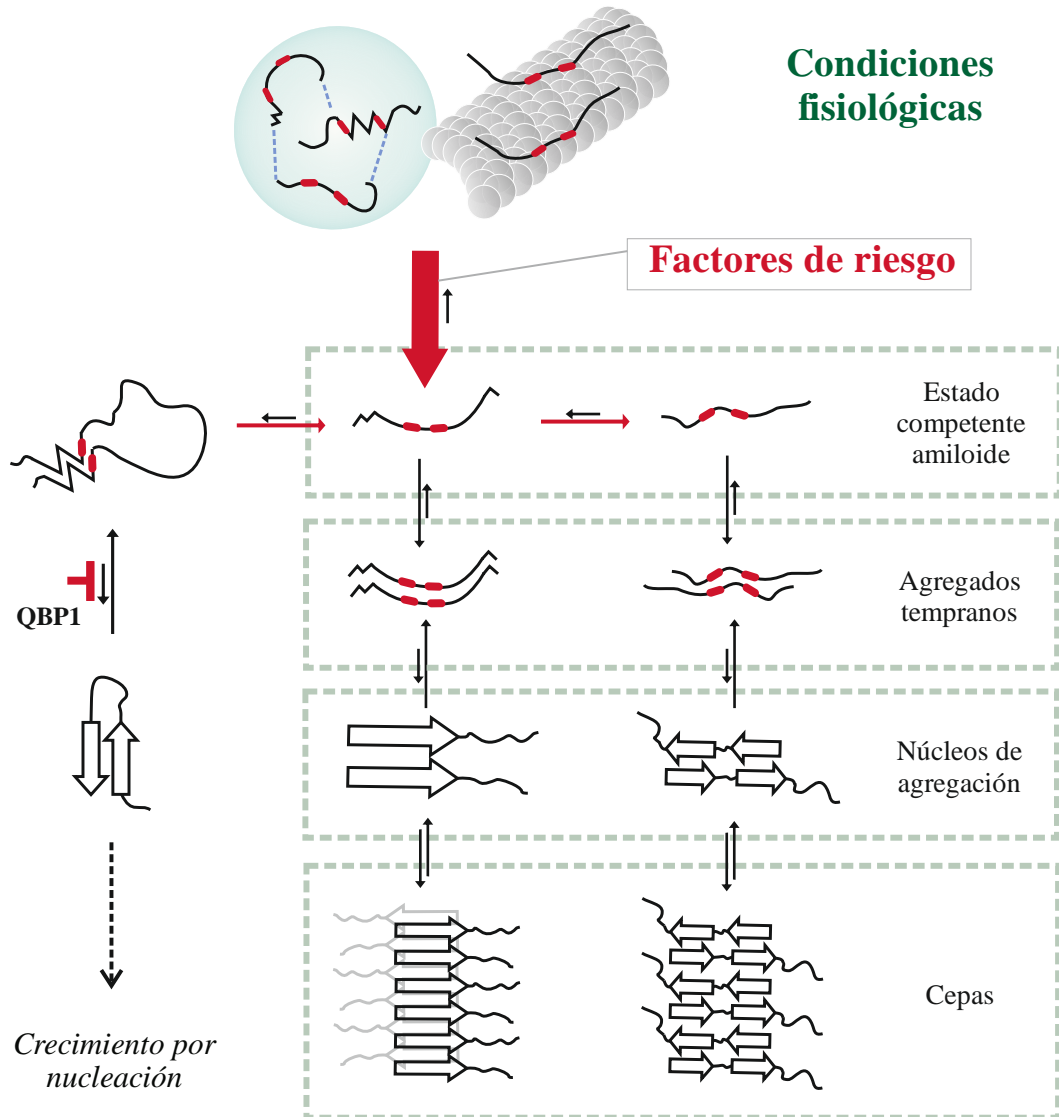


Figura 5-1. Modelo tipo *conversión conformacional nucleada* de la cascada amiloidogénica de tau. En condiciones fisiológicas, tau puede encontrarse estabilizando a los microtúbulos o formando LLPS, donde los monómeros estarían fluctuando entre varias conformaciones en un equilibrio termodinámico y formando una red de interacciones débiles entre ellos. El cambio conformacional que desencadenaría la cascada tradicional del crecimiento nucleado no está favorecido, siendo en este paso donde actúa QBP1. Factores de riesgo generarían conformaciones extendidas de tau o *monómeros competentes amiloides*, donde se exponen las regiones hidrofóbicas y se permiten los contactos intermoleculares que generan distintos *agregados tempranos*. Tras un reajuste conformacional, se generan los *núcleos de agregación* o *cepas*, cuya elongación vendrá dada por un crecimiento molde-inducido que originará *fibras con diferentes morfologías*.

Los novedosos resultados obtenidos recientemente por Mirbaha et. al [86] son compatibles con nuestros resultados, pero no encajan con el modelo anterior propuesto. En este estudio se diferencian dos tipos de monómeros de tau: M_i (“*inert monomer*”) y M_s (“*seed competent monomer*”). M_i es estable en el tiempo y no tiene efectos en la agregación, mientras que M_s desencadena la formación amiloide en células y en el tubo de ensayo, y muestra propiedades intrínsecas para el autoensamblaje.

En cuanto a sus características estructurales, M_i presenta interacciones locales y distantes, donde se incluye MBD, mientras que M_s presenta una consistente interacción de K150 (en el dominio de proyección) con K254, K267, K274 (R1) o K280 (R2) y no se describen interacciones intramoleculares en la región de las repeticiones. Comparando estos resultados con nuestros datos, M_i haría referencia a la población estructurada de tau, no asociada a la agregación y M_s se asociaría a la población No-estructurada, vinculada a la agregación. En nuestros experimentos, no veríamos la interacción entre el dominio de proyección y R1/R2, ya que en el diseño experimental solo está incluido el MBD. Además, el modelado de M_i predice que los residuos VQIINK/VQIVYK quedarían inaccesibles por la formación de una *horquilla*, mientras que quedan expuestos en M_s , tal y como habíamos propuesto en párrafos anteriores. Sin embargo, en este trabajo se presenta a esta conformación del **monómero como molde/núcleo para el crecimiento** de la fibra, mientras anteriormente la habíamos propuesto como un **monómero en un estado competente amiloide** que originaría posteriormente el núcleo de agregación. Habíamos propuesto la interacción entre dos moléculas extendidas de tau para estabilizar esa conformación donde los hexapéptidos hidrofóbicos quedarían expuestos. Sin embargo, la interacción del dominio de proyección con R1 y R2 podría dar lugar a un conformero estable que sí pudiera actuar como núcleo. Sin embargo, hasta la fecha, los núcleos de agregación amiloide propuestos son ricos en estructura- β [14]. Está descrito que son los motivos hexapeptídicos de tau los que sufren una transformación local a estructura- β mientras se encuentran en un entorno global desestructurado y, finalmente, es el hexapéptido presente en la repetición tres, R3, el que llega a formar parte del núcleo rígido de agregación de los PHFs[23, 31]. Además, aunque en este trabajo se hayan purificado con éxito los distintos monómeros, dado el dinamismo propio de las aIDPs, es muy difícil asegurar que el “*seeding*” observado venga dado por el monómero y no por un complejo posterior (como podría ser un dímero), cuya formación estaría muy favorecida por partir de estados monoméricos competentes amiloides.

Adicionalmente, pueden llevarse a cabo análisis cinéticos de las fases lag y de autoensamblaje para confirmar y profundizar en la ruta de agregación de tau y sus

mutantes[87]. En el modelo de *conversión conformacional nucleada*, cuando existen grandes concentraciones de proteína, aumentan proporcionalmente los complejos amorfos y estructurados, mostrando leves variaciones en las fases lag y de ensamblaje[12]. En cambio, en la *conversión conformacional del monómero*, el monómero en solución sufre una transformación a un estado estable de ensamblaje[88]. Este último modelo, propuesto por primera vez para explicar la propagación priónica de scrapie, es el que parece encajar con los datos y conclusiones sacadas en el trabajo de Mirbaha et. al [86]. Las cinéticas de agregación de ambos mecanismos son muy diferentes por lo que este experimento podría ser suficiente para esclarecer qué ruta sigue tau para su agregación amiloide. Más aún, si se partiera del monómero M_s (que se consigue purificar en el trabajo) la agregación debería ser exponencial desde el primer momento, pues el paso limitante para la agregación sería este cambio conformacional que ya habríamos superado. Este mecanismo típico priónico es coherente con el comportamiento tipo priónico de tau descrito principalmente por el grupo [84, 89], y sirve como apoyo a su línea de investigación actual[90].

Clarificar la ruta de agregación de tau y fijar así la diana terapéutica ideal no sólo es altamente útil para abordar el **tratamiento de las taupatías primarias**, sino que también puede ser clave para el tratamiento de **EA**. Actualmente (revisado en enero 2018), hay 112 compuestos que están en diferentes fases clínicas como posibles tratamientos para EA[91]. De ellos, 26 se encuentran en fase III con varios enfoques terapéuticos, tales como la eliminación de las placas de $A\beta$, reducción de su producción, mejora de los síntomas neuropsiquiátricos o promoción de la neurogénesis. Sin embargo, la hipótesis de la cascada amiloidogénica, que postula la acumulación del $A\beta$ como causante primario de la enfermedad y que ha sido favorecida durante los últimos 25 años para explicar este desorden, está empezando a ser cuestionada[92]. Esto se basa en hechos como el que ratones transgénicos que acumulan fibras de $A\beta$ no generan la formación de NFT; que la acumulación de $A\beta$ en ratones BRI2- $A\beta$ no produce muerte neuronal ni pérdida de funciones cognitivas; o que pacientes sin EA pueden tener igual o incluso más cantidad de placas seniles que pacientes con EA. Sin embargo, se ha reportado que las lesiones en tau son previas a la acumulación de $A\beta$, que la transmisión intercelular de los depósitos de tau se correlaciona fuertemente con la progresión de los síntomas cognitivos y clínicos; o que la supresión o delección de tau genera un gran efecto protector contra daños neuronales y déficits neurológicos. Se ha propuesto que es la disfunción metabólica del APP, que causa alteraciones celulares a distintos niveles como la acumulación de $A\beta$ y no el $A\beta$ *per se*, lo que desencadena el EA y que es la patología de tau la que está encargada de su progresión[92].

Todo ello nos lleva a centrarnos en tau como diana terapéutica, y en la inhibición de su agregación como bloqueo de, al menos, uno de los primeros eventos de la enfermedad, tanto en EA como en las taupatías primarias. El compuesto de segunda generación TRx0237 es una versión modificada del azul de metileno, usado durante décadas para tratar la malaria. Se encuentra en fase clínica III (Identificador NCT01626378 en *ClinicalTrials.gov*), y la inhibición de la amiloidogénesis de tau se lleva a cabo por la oxidación no específica de las cisteínas del MBD, generando una estructura compacta que impide la interacción intermolecular[93]. Según nuestro modelo, este componente estaría desplazando el equilibrio del monómero a un estado compacto, no competente amiloide. Otras estrategias buscan una diana más específica basándose en el modelo “*Gain-of-Interaction*”, que establece que secuencias cortas concretas de la proteína son las encargadas de llevar a cabo la formación amiloide[94]. En 2011, se identificó un segmento capaz de formar cremalleras estéricas[95] y que incluía el hexapéptido VQIVYK presente en la repetición R3 de tau. Por microcristalografía de rayos-X se determinó la estructura atómica de la cremallera estérica con el fin de diseñar racionalmente un componente que bloqueara su formación. La agregación consiguió ser inhibida, aunque sólo para la isoforma 3R de tau[96]. Buscando poder inhibir también la fibrillogénesis de la isoforma R4, se buscó resolver la estructura atómica de la cremallera estérica formada por el péptido VQIINK presente en la segunda repetición, esta vez mediante criomicroscopía electrónica. Un segmento de 10 residuos que contiene el hexapéptido fue capaz de formar al menos tres tipos diferentes de cremalleras estéricas, algo que sugiere que pueda derivarse en, al menos, tres tipos diferentes de fibras amiloides que causarían distintos efectos fenotípicos[97]. Quizás esta variabilidad esté relacionada con el polimorfismo que hemos encontrado en el primer paso de la cascada, el comportamiento del monómero. Los inhibidores testados ralentizan la agregación *in vitro* y bloquean el ensamblaje inducido por las fibras de la proteína completa. Sin embargo, esto parece contrastar paradójicamente con el hecho de que el núcleo de las fibras amiloides de tau esté formado por las repeticiones 3 y 4, quedando el resto de la proteína en la zona denominada “*fuzzy coat*”[31]. A pesar de que estos hexapéptidos puedan tener papeles distintos en la agregación, el hecho de que se expongan en las condiciones proamiloidogénicas parece indicar la relevancia de las dos regiones, sugiriendo que ambas deben ser consideradas a la hora de abordar el bloqueo de tau.

Los resultados aquí presentados, puestos en contexto con los trabajos disponibles en la literatura, generan nuevas preguntas que plantean posibles experimentos futuros, algunos ya mencionados a lo largo de la presente discusión. En relación a la propuesta de unión entre monómeros que posteriormente generan el

núcleo de agregación, y sabiendo las secuencias que forman las cremalleras estéricas en las fibras de tau, sería interesante estudiar esta interacción intermolecular en solución, por AFM-SMFS. Nuestro grupo recientemente ha desarrollado una estrategia con controles internos que permite la identificación directa e inequívoca de las interacciones proteína-proteína en AFM-SMFS[98]; sin embargo, desafortunadamente ésta estrategia no podría ser usada porque nuestras secuencias de interés son regiones desordenadas y además está basada en la generación de puentes disulfuro por oxidación. Una posible solución sería insertar las dos secuencias de forma contigua dentro de la proteína portadora, añadiendo repeticiones de glicina entre ellas para dar flexibilidad a la construcción y permitir que las dos secuencias fluctúen e interaccionan libremente. También se podría abordar la hipotética formación de un trímero como núcleo de agregación, insertando en este caso tres secuencias repetidas.

Las conformaciones prionoides también serían una cuestión a abordar. Dado que la elongación de las distintas cepas de tau parece darse por la adición del monómero a la estructura nucleada por un mecanismo molde-dependiente, se podría identificar la conformación monomérica que contribuye al crecimiento de fibras morfológicamente diferentes. La poliproteína donde se encuentra insertada tau, se incubaría con fibras y protofibras de una determinada cepa. Teóricamente, dado el carácter prionoide de tau, el monómero cambiaría de conformación para poder incorporarse a la fibra, adquiriendo una estructura estable que podría ser desplegada por AFM-SMFS.

Por otro lado, debemos tener en cuenta las limitaciones técnicas del AFM. Su límite inferior de detección de fuerzas es de 20 pN y aquellos eventos que no presentaban ningún pico de fuerza (NM) se han atribuido a confórmers en ovillo estadístico. Sin embargo, no podemos descartar que la pérdida de eventos mecanoestables sea debida a una reestructuración del monómero hacia plegamientos con estabilidades más bajas (<20 pN), que pudieran jugar un papel relevante en la agregación. Para estudiar esta posibilidad, podrían llevarse a cabo estudios mediante pinzas ópticas, dada su mayor sensibilidad en el rango de fuerzas bajas. El análisis de las estructuras de baja estabilidad de otra NP, α -sinucleína, ya ha sido abordado mediante esta técnica. Se describieron estructuras del rango de ~5-15 pN[99], conformaciones que con nuestro abordaje experimental hubiesen sido tomadas como confórmers en un estado de ovillo estadístico.

A pesar de sus limitaciones, el AFM-SMFS con la estrategia pFS-2 es una metodología muy robusta que nos permite estudiar el polimorfismo conformacional de IDPs. Sin embargo la adquisición y el análisis de datos son tareas que podían ser

mejoradas en muchos sentidos sólo con el uso de un portador de mayor mecanoestabilidad que los marcadores monomoleculares, como propuso nuestro laboratorio en un trabajo teórico[100]. Esta idea se basa en que el desplegamiento del hospedador ocurra con posterioridad al desplegamiento de los marcadores de monomolecularidad. En esta tesis también he abordado este reto experimental. Para el desarrollo de esta nueva estrategia, hemos utilizado el módulo cohesina c8C de la escafoldina CipC de *Clostridium cellulolyticum* como proteína portadora. Este trabajo ha implicado el uso de diversos métodos y técnicas: modelaje de estructura y simulaciones computacionales, ingeniería y producción de proteínas, técnicas biofísicas promedio y SMFS. Las curvas SMFS muestran que el desplegamiento de este hospedador mecanoestable tiene lugar tras los marcadores de monomolecularidad, actuando como un reportero que precede y anuncia la señal que proviene de la IDP de interés, que aparecerá por tanto de un modo no-fragmentado al final del registro de SMFS. Este enfoque evita el ruido de la región proximal y simplifica el análisis enormemente. Esta nueva estrategia tiene varias ventajas: es fácil de implementar, permite una fácil identificación de registros válidos y facilita un análisis de datos eficiente. La caracterización nanomecánica detallada del polimorfismo conformacional de aIDPs podría obtenerse de forma casi inmediata con esta estrategia, tanto por investigadores expertos como no expertos. Representa pues una nueva herramienta para la nanociencia y la nanotecnología, con un gran potencial para futuros desarrollos como la automatización de la adquisición y análisis de datos, pues presenta un patrón simple fácilmente modelizable.

Sin embargo, a pesar de todos los avances conseguidos mediante esta estrategia, se le puede encontrar todavía una desventaja: un menor número de registros analizables por experimento. Ya que la proteína portadora debe ser la última en desplegarse y requiere mayores fuerzas, se han encontrado un gran número de registros que contenían sólo marcadores de monomolecularidad. Interpretamos estos resultados asumiendo que la unión entre la punta y la muestra y/o la muestra y el sustrato no siempre eran tan mecanoestables como para resistir el desplegamiento de todos los elementos del sistema. Teniendo esto en cuenta, un desarrollo alternativo podría consistir en el descenso de la estabilidad mecánica de los dos componentes del sistema (marcadores de monomolecularidad y proteína portadora) mientras se continúa manteniendo una significativa diferencia entre ambas mecanoestabilidades. Podrían seguir utilizándose los portadores I27 y ubicuitina previamente caracterizados y habría que desarrollar una poliproteína que actuara como marcadora de monomolecularidad, cuyos módulos tuvieran una mecanoestabilidad considerablemente inferior a los 200 pN de aquellos. Sin embargo, se ha de puntualizar

que este diseño tendría el inconveniente práctico de no ser compatible con otros vectores SMFS, ya que normalmente están basados en I27 o ubicuitina.

Con la reciente fabricación de AFMs comerciales especializados en SMFS junto con el uso de la estrategia que presentamos en esta tesis, esperamos que la accesibilidad del estudio nanomecánico de proteínas se vea ampliada. En concreto, nuestro interés se centra en que el abordaje por AFM-SMFS de proteínas tan interesantes y de tanto impacto como las amiloides deje de estar restringido a especialistas y llegue a cualquier científico interesado en comprender su estructura y comportamiento.

Parte VI

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

A continuación, pasaré a enumerar las conclusiones más representativas del presente trabajo:

BLOQUE I. Bases moleculares del malplegamiento de tau.

1. Se ha validado el uso del vector pFS-2 para el estudio del MBD de tau *wt* y sus mutantes proagregantes causantes de FTDP-17 Δ 280K y P301L.
2. Se ha demostrado que estas tres secuencias de tau presentan un elevado polimorfismo conformacional, pudiendo adquirir estructuras que abarcan toda la longitud de la molécula y que presentan varias mecanoestabilidades, sin preferencia por ninguna de ellas.
3. El péptido antiagregante QBP1 no inhibe la amiloidogénesis de tau ni modula su comportamiento monomérico, al igual que ocurre con la proteína neurotóxica $A\beta$ y contrario a lo que sucede con los amiloides poliQs, α -sinucleína, Sup35 y Orb2.
4. El polimorfismo de tau puede ser modulado por la inserción de mutaciones puntuales y cambios en el medio, lo que ha permitido asociar la desestructuración del monómero con su amiloidogénesis.
5. Los mutantes proagregantes causantes de FTDP-17 muestran comportamientos distintos a nivel de monómero, que pueden ser la causa de sus diferencias en la fibrillogénesis y de los síntomas asociados a la enfermedad.

BLOQUE II. Desarrollo de una herramienta para el análisis eficiente y simplificado de aIDPs.

1. Se ha caracterizado mecánicamente el módulo c8C de la escafoldina CipC de *Clostridium cellulolyticum*, que presenta una mecanoestabilidad de 350 ± 66 pN.
2. Se ha comprobado que el módulo c8C mantiene su integridad estructural cuando alberga IDPs y éstas conservan sus características amiloidogénicas, pudiendo así actuar como hospedador de alta estabilidad y reportero de la señal de interés.
3. La estrategia ha sido validada por SMFS. Se ha demostrado que es una herramienta fácil de implementar y que permite un análisis sencillo y eficiente de IDPs debido a la inmediata identificación de registros válidos y señal de interés libre de ruido.

Parte VII

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts B, J.A., Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P *The molecular biology of the cell*. 4^a edn. Garland Science, Nueva York, 2002: p. 1103.
2. Mathews C.K.; Van Holde, K.E.A., K.G., *Bioquímica*. 2002: Pearson Education, S.A.
3. Levinthal, C., *Are there pathways for protein folding?* J. Chim. Phys, 1968. **65**: p. 44-45.
4. Anfinsen, C.B., *Principles that govern the folding of protein chains*. Science, 1973. **181**(4096): p. 223-30.
5. Dill, K.A. and H.S. Chan, *From Levinthal to pathways to funnels*. Nat Struct Biol, 1997. **4**(1): p. 10-9.
6. Turoverov, K.K., I.M. Kuznetsova, and V.N. Uversky, *The protein kingdom extended: ordered and intrinsically disordered proteins, their folding, supramolecular complex formation, and aggregation*. Prog Biophys Mol Biol, 2010. **102**(2-3): p. 73-84.
7. Uversky, V.N., *Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics*. Protein Sci, 2002. **11**(4): p. 739-56.
8. Breydo, L. and V.N. Uversky, *Structural, morphological, and functional diversity of amyloid oligomers*. FEBS Lett, 2015. **589**(19 Pt A): p. 2640-8.
9. Fandrich, M., *Oligomeric intermediates in amyloid formation: structure determination and mechanisms of toxicity*. J Mol Biol, 2012. **421**(4-5): p. 427-40.
10. Radford, S.E. and J.S. Weissman, *Special issue: the molecular and cellular mechanisms of amyloidosis*. J Mol Biol, 2012. **421**(2-3): p. 139-41.
11. Lomakin, A., D.S. Chung, G.B. Benedek, D.A. Kirschner, and D.B. Teplow, *On the nucleation and growth of amyloid beta-protein fibrils: detection of nuclei and quantitation of rate constants*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(3): p. 1125-9.
12. Serio, T.R., A.G. Cashikar, A.S. Kowal, G.J. Sawicki, J.J. Moslehi, L. Serpell, M.F. Arnsdorf, and S.L. Lindquist, *Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant*. Science, 2000. **289**(5483): p. 1317-21.
13. Chiti, F. and C.M. Dobson, *Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade*. Annu Rev Biochem, 2017. **86**: p. 27-68.
14. Bemporad, F. and F. Chiti, *Protein misfolded oligomers: experimental approaches, mechanism of formation, and structure-toxicity relationships*. Chem Biol, 2012. **19**(3): p. 315-27.
15. Hyman, A.A., C.A. Weber, and F. Julicher, *Liquid-liquid phase separation in biology*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2014. **30**: p. 39-58.
16. Bergeron-Sandoval, L.P., N. Safaee, and S.W. Michnick, *Mechanisms and Consequences of Macromolecular Phase Separation*. Cell, 2016. **165**(5): p. 1067-1079.

17. Schmidt, H.B. and D. Gorlich, *Transport Selectivity of Nuclear Pores, Phase Separation, and Membraneless Organelles*. Trends Biochem Sci, 2016. **41**(1): p. 46-61.
18. Avila, J., J.J. Lucas, M. Perez, and F. Hernandez, *Role of tau protein in both physiological and pathological conditions*. Physiol Rev, 2004. **84**(2): p. 361-84.
19. Mietelska-Porowska, A., U. Wasik, M. Goras, A. Filipek, and G. Niewiadomska, *Tau protein modifications and interactions: their role in function and dysfunction*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(3): p. 4671-713.
20. Neve, R.L., P. Harris, K.S. Kosik, D.M. Kurnit, and T.A. Donlon, *Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2*. Brain Res, 1986. **387**(3): p. 271-80.
21. Gonzalez-Billault, C., M. Engelke, E.M. Jimenez-Mateos, F. Wandosell, A. Caceres, and J. Avila, *Participation of structural microtubule-associated proteins (MAPs) in the development of neuronal polarity*. J Neurosci Res, 2002. **67**(6): p. 713-9.
22. Gendron, T.F. and L. Petrucelli, *The role of tau in neurodegeneration*. Mol Neurodegener, 2009. **4**: p. 13.
23. Daebel, V., S. Chinnathambi, J. Biernat, M. Schwalbe, B. Habenstein, A. Loquet, E. Akoury, K. Tepper, H. Muller, M. Baldus, C. Griesinger, M. Zweckstetter, E. Mandelkow, V. Vijayan, and A. Lange, *beta-Sheet core of tau paired helical filaments revealed by solid-state NMR*. J Am Chem Soc, 2012. **134**(34): p. 13982-9.
24. Goode, B.L., M. Chau, P.E. Denis, and S.C. Feinstein, *Structural and functional differences between 3-repeat and 4-repeat tau isoforms. Implications for normal tau function and the onset of neurodegenerative disease*. J Biol Chem, 2000. **275**(49): p. 38182-9.
25. Ambadipudi, S., J. Biernat, D. Riedel, E. Mandelkow, and M. Zweckstetter, *Liquid-liquid phase separation of the microtubule-binding repeats of the Alzheimer-related protein Tau*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 275.
26. Vanderweyde, T., D.J. Apicco, K. Youmans-Kidder, P.E.A. Ash, C. Cook, E. Lummertz da Rocha, K. Jansen-West, A.A. Frame, A. Citro, J.D. Leszyk, P. Ivanov, J.F. Abisambra, M. Steffen, H. Li, L. Petrucelli, and B. Wolozin, *Interaction of tau with the RNA-Binding Protein TIA1 Regulates tau Pathophysiology and Toxicity*. Cell Rep, 2016. **15**(7): p. 1455-1466.
27. Arendt, T., J.T. Stieler, and M. Holzer, *Tau and tauopathies*. Brain Res Bull, 2016. **126**(Pt 3): p. 238-292.
28. Wszolek, Z.K., Y. Tsuboi, B. Ghetti, S. Pickering-Brown, Y. Baba, and W.P. Cheshire, *Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17)*. Orphanet J Rare Dis, 2006. **1**: p. 30.
29. Combs, B. and T.C. Gambelin, *FTDP-17 tau mutations induce distinct effects on aggregation and microtubule interactions*. Biochemistry, 2012. **51**(43): p. 8597-607.
30. Barghorn, S., Q. Zheng-Fischhofer, M. Ackmann, J. Biernat, M. von Bergen, E.M. Mandelkow, and E. Mandelkow, *Structure, microtubule interactions, and paired helical filament aggregation by tau mutants of frontotemporal dementias*. Biochemistry, 2000. **39**(38): p. 11714-21.

31. Fitzpatrick, A.W.P., B. Falcon, S. He, A.G. Murzin, G. Murshudov, H.J. Garringer, R.A. Crowther, B. Ghetti, M. Goedert, and S.H.W. Scheres, *Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease*. Nature, 2017. **547**(7662): p. 185-190.
32. Shammass, S.L., G.A. Garcia, S. Kumar, M. Kjaergaard, M.H. Horrocks, N. Shivji, E. Mandelkow, T.P. Knowles, E. Mandelkow, and D. Klenerman, *A mechanistic model of tau amyloid aggregation based on direct observation of oligomers*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 7025.
33. Marko, J.F. and E.D. Siggia, *Stretching DNA*. Macromolecules 1995. **28**: p. 8759-70.
34. Carrión-Vázquez, M.O., Andres; Diez, Hector; Hervás, Rubén; Oroz, Javier; Fernández, Jesús & Martínez-Martín, David., *Protein Nanomechanics — as Studied by AFM Single-Molecule Force Spectroscopy.*, in *Advanced Techniques in Biophysics*. 2007, Springer. p. 163-245.
35. Ainavarapu, S.R., J. Brujic, H.H. Huang, A.P. Wiita, H. Lu, L. Li, K.A. Walther, M. Carrion-Vazquez, H. Li, and J.M. Fernandez, *Contour length and refolding rate of a small protein controlled by engineered disulfide bonds*. Biophys J, 2007. **92**(1): p. 225-33.
36. Oroz, J., R. Hervas, and M. Carrion-Vazquez, *Unequivocal single-molecule force spectroscopy of proteins by AFM using pFS vectors*. Biophys J, 2012. **102**(3): p. 682-90.
37. Hervas, R., J. Oroz, A. Galera-Prat, O. Goni, A. Valbuena, A.M. Vera, A. Gomez-Sicilia, F. Losada-Urzaiz, V.N. Uversky, M. Menendez, D.V. Laurents, M. Bruix, and M. Carrion-Vazquez, *Common features at the start of the neurodegeneration cascade*. PLoS Biol, 2012. **10**(5): p. e1001335.
38. Nagai, Y., T. Tucker, H. Ren, D.J. Kenan, B.S. Henderson, J.D. Keene, W.J. Strittmatter, and J.R. Burke, *Inhibition of polyglutamine protein aggregation and cell death by novel peptides identified by phage display screening*. J Biol Chem, 2000. **275**(14): p. 10437-42.
39. Sali, A. and T.L. Blundell, *Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints*. J Mol Biol, 1993. **234**(3): p. 779-815.
40. Larkin, M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson, and D.G. Higgins, *Clustal W and Clustal X version 2.0*. Bioinformatics, 2007. **23**(21): p. 2947-8.
41. Tsui, V. and D.A. Case, *Theory and applications of the generalized Born solvation model in macromolecular simulations*. Biopolymers, 2000. **56**(4): p. 275-91.
42. Simonson, T., *Macromolecular electrostatics: continuum models and their growing pains*. Curr Opin Struct Biol, 2001. **11**(2): p. 243-52.
43. Bashford, D. and D.A. Case, *Generalized born models of macromolecular solvation effects*. Annu Rev Phys Chem, 2000. **51**: p. 129-52.
44. Humphrey, W., A. Dalke, and K. Schulten, *VMD: visual molecular dynamics*. J Mol Graph, 1996. **14**(1): p. 33-8, 27-8.
45. Calakos, N., M.K. Bennett, K.E. Peterson, and R.H. Scheller, *Protein-protein interactions contributing to the specificity of intracellular vesicular trafficking*. Science, 1994. **263**(5150): p. 1146-9.

46. Quiviger, B., C. Franche, G. Lutfalla, D. Rice, R. Haselkorn, and C. Elmerich, *Cloning of a nitrogen fixation (nif) gene cluster of Azospirillum brasilense*. *Biochimie*, 1982. **64**(7): p. 495-502.
47. Steward, A., J.L. Toca-Herrera, and J. Clarke, *Versatile cloning system for construction of multimeric proteins for use in atomic force microscopy*. *Protein Sci*, 2002. **11**(9): p. 2179-83.
48. Carrion-Vazquez, M., A.F. Oberhauser, S.B. Fowler, P.E. Marszalek, S.E. Broedel, J. Clarke, and J.M. Fernandez, *Mechanical and chemical unfolding of a single protein: a comparison*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(7): p. 3694-9.
49. Bohm, G., R. Muhr, and R. Jaenicke, *Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks*. *Protein Eng*, 1992. **5**(3): p. 191-5.
50. Pace, C.N. and D.V. Laurents, *A new method for determining the heat capacity change for protein folding*. *Biochemistry*, 1989. **28**(6): p. 2520-5.
51. Piotto, M., V. Saudek, and V. Sklenar, *Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions*. *J Biomol NMR*, 1992. **2**(6): p. 661-5.
52. Wurth, C., N.K. Guimard, and M.H. Hecht, *Mutations that reduce aggregation of the Alzheimer's Abeta42 peptide: an unbiased search for the sequence determinants of Abeta amyloidogenesis*. *J Mol Biol*, 2002. **319**(5): p. 1279-90.
53. Barghorn, S., J. Biernat, and E. Mandelkow, *Purification of recombinant tau protein and preparation of Alzheimer-paired helical filaments in vitro*. *Methods Mol Biol*, 2005. **299**: p. 35-51.
54. Schlierf, M., H. Li, and J.M. Fernandez, *The unfolding kinetics of ubiquitin captured with single-molecule force-clamp techniques*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(19): p. 7299-304.
55. Valbuena, A., J. Oroz, A.M. Vera, A. Gimeno, J. Gomez-Herrero, and M. Carrion-Vazquez, *Quasi-simultaneous imaging/pulling analysis of single polyprotein molecules by atomic force microscopy*. *Rev Sci Instrum*, 2007. **78**(11): p. 113707.
56. Florin, E.L., M. Rief, H. Lehmann, M. Ludwig, C. Dornmair, V.T. Moy, and H.E. Gaub, *Sensing specific molecular interactions with the atomic force microscope*. *Biosens Bioelectron* 1995. **10**: p. 895-901.
57. Bustamante, C., Y.R. Chemla, N.R. Forde, and D. Izhaky, *Mechanical processes in biochemistry*. *Annu Rev Biochem*, 2004. **73**: p. 705-48.
58. Carrion-Vazquez, M., H. Li, H. Lu, P.E. Marszalek, A.F. Oberhauser, and J.M. Fernandez, *The mechanical stability of ubiquitin is linkage dependent*. *Nat Struct Biol*, 2003. **10**(9): p. 738-43.
59. Sandal, M., F. Valle, I. Tessari, S. Mammi, E. Bergantino, F. Musiani, M. Bruciale, L. Bubacco, and B. Samori, *Conformational equilibria in monomeric alpha-synuclein at the single-molecule level*. *PLoS Biol*, 2008. **6**(1): p. e6.
60. Wang, L., E.V. Rivera, M.G. Benavides-Garcia, and B.T. Nall, *Loop entropy and cytochrome c stability*. *J Mol Biol*, 2005. **353**(3): p. 719-29.
61. Carrion-Vazquez, M., A.F. Oberhauser, T.E. Fisher, P.E. Marszalek, H. Li, and J.M. Fernandez, *Mechanical design of proteins studied by single-molecule force spectroscopy and protein engineering*. *Prog Biophys Mol Biol*, 2000. **74**(1-2): p. 63-91.

62. Radley, T.L., A.I. Markowska, B.T. Bettinger, J.H. Ha, and S.N. Loh, *Allosteric switching by mutually exclusive folding of protein domains*. J Mol Biol, 2003. **332**(3): p. 529-36.
63. Di Stefano, D.L. and A.J. Wand, *Two-dimensional 1H NMR study of human ubiquitin: a main chain directed assignment and structure analysis*. Biochemistry, 1987. **26**(23): p. 7272-81.
64. Jeganathan, S., M. von Bergen, E.M. Mandelkow, and E. Mandelkow, *The natively unfolded character of tau and its aggregation to Alzheimer-like paired helical filaments*. Biochemistry, 2008. **47**(40): p. 10526-39.
65. Zhu, H.L., C. Fernandez, J.B. Fan, F. Shewmaker, J. Chen, A.P. Minton, and Y. Liang, *Quantitative characterization of heparin binding to Tau protein: implication for inducer-mediated Tau filament formation*. J Biol Chem, 2010. **285**(6): p. 3592-9.
66. Xu, S., K.R. Brunden, J.Q. Trojanowski, and V.M. Lee, *Characterization of tau fibrillization in vitro*. Alzheimers Dement, 2010. **6**(2): p. 110-7.
67. Kaye, R., E. Head, J.L. Thompson, T.M. McIntire, S.C. Milton, C.W. Cotman, and C.G. Glabe, *Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis*. Science, 2003. **300**(5618): p. 486-9.
68. Krishnan, R., J.L. Goodman, S. Mukhopadhyay, C.D. Pacheco, E.A. Lemke, A.A. Deniz, and S. Lindquist, *Conserved features of intermediates in amyloid assembly determine their benign or toxic states*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(28): p. 11172-7.
69. Hervas, R., L. Li, A. Majumdar, C. Fernandez-Ramirez Mdel, J.R. Unruh, B.D. Slaughter, A. Galera-Prat, E. Santana, M. Suzuki, Y. Nagai, M. Bruix, S. Casas-Tinto, M. Menendez, D.V. Laurents, K. Si, and M. Carrion-Vazquez, *Molecular Basis of Orb2 Amyloidogenesis and Blockade of Memory Consolidation*. PLoS Biol, 2016. **14**(1): p. e1002361.
70. Dudko, O.K., G. Hummer, and A. Szabo, *Theory, analysis, and interpretation of single-molecule force spectroscopy experiments*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(41): p. 15755-60.
71. Valbuena, A., J. Oroz, R. Hervas, A.M. Vera, D. Rodriguez, M. Menendez, J.I. Sulkowska, M. Cieplak, and M. Carrion-Vazquez, *On the remarkable mechanostability of scaffoldins and the mechanical clamp motif*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(33): p. 13791-6.
72. Galera-Prat, A., Sarah Moraís, S. Yael Vazana, Y., Bayer, E. and Carrión-Vázquez, M., *The cohesin module is a major determinant of mechanical stability in the cellulosome*. J. Biol. Chem., 2018.
73. Improta, S., A.S. Politou, and A. Pastore, *Immunoglobulin-like modules from titin I-band: extensible components of muscle elasticity*. Structure, 1996. **4**(3): p. 323-37.
74. Arslan, P.E., V.K. Mulligan, S. Ho, and A. Chakrabarty, *Conversion of Abeta42 into a folded soluble native-like protein using a semi-random library of amphipathic helices*. J Mol Biol, 2010. **396**(5): p. 1284-94.
75. Wegmann, S., J. Scholer, C.A. Bippes, E. Mandelkow, and D.J. Muller, *Competing interactions stabilize pro- and anti-aggregant conformations of human Tau*. J Biol Chem, 2011. **286**(23): p. 20512-24.

76. Gosal, W.S., I.J. Morten, E.W. Hewitt, D.A. Smith, N.H. Thomson, and S.E. Radford, *Competing pathways determine fibril morphology in the self-assembly of beta2-microglobulin into amyloid*. J Mol Biol, 2005. **351**(4): p. 850-64.
77. Eschmann, N.A., E.R. Georgieva, P. Ganguly, P.P. Borbat, M.D. Rappaport, Y. Akdogan, J.H. Freed, J.E. Shea, and S. Han, *Signature of an aggregation-prone conformation of tau*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 44739.
78. Larini, L., M.M. Gessel, N.E. LaPointe, T.D. Do, M.T. Bowers, S.C. Feinstein, and J.E. Shea, *Initiation of assembly of tau(273-284) and its DeltaK280 mutant: an experimental and computational study*. Phys Chem Chem Phys, 2013. **15**(23): p. 8916-28.
79. Wojciechowski, M., P. Szymczak, M. Carrion-Vazquez, and M. Cieplak, *Protein unfolding by biological unfoldases: insights from modeling*. Biophys J, 2014. **107**(7): p. 1661-8.
80. Congdon, E.E., S. Kim, J. Bonchak, T. Songrug, A. Matzavinos, and J. Kuret, *Nucleation-dependent tau filament formation: the importance of dimerization and an estimation of elementary rate constants*. J Biol Chem, 2008. **283**(20): p. 13806-16.
81. Wegmann, S., B. Eftekharzadeh, K. Tepper, K.M. Zoltowska, R.E. Bennett, S. Dujardin, P.R. Laskowski, D. MacKenzie, T. Kamath, C. Commins, C. Vanderburg, A.D. Roe, Z. Fan, A.M. Molliex, A. Hernandez-Vega, D. Muller, A.A. Hyman, E. Mandelkow, J.P. Taylor, and B.T. Hyman, *Tau protein liquid-liquid phase separation can initiate tau aggregation*. EMBO J, 2018. **37**(7).
82. Peelaerts, W., L. Bousset, A. Van der Perren, A. Moskalyuk, R. Pulizzi, M. Giugliano, C. Van den Haute, R. Melki, and V. Baekelandt, *alpha-Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration*. Nature, 2015. **522**(7556): p. 340-4.
83. Liu, P., M.N. Reed, L.A. Kotilinek, M.K. Grant, C.L. Forster, W. Qiang, S.L. Shapiro, J.H. Reichl, A.C. Chiang, J.L. Jankowsky, C.M. Wilmot, J.P. Cleary, K.R. Zahs, and K.H. Ashe, *Quaternary Structure Defines a Large Class of Amyloid-beta Oligomers Neutralized by Sequestration*. Cell Rep, 2015. **11**(11): p. 1760-71.
84. Sanders, D.W., S.K. Kaufman, S.L. DeVos, A.M. Sharma, H. Mirbaha, A. Li, S.J. Barker, A.C. Foley, J.R. Thorpe, L.C. Serpell, T.M. Miller, L.T. Grinberg, W.W. Seeley, and M.I. Diamond, *Distinct tau prion strains propagate in cells and mice and define different tauopathies*. Neuron, 2014. **82**(6): p. 1271-88.
85. Hyman, B.T., *Tau propagation, different tau phenotypes, and prion-like properties of tau*. Neuron, 2014. **82**(6): p. 1189-90.
86. Mirbaha, H., D. Chen, O.A. Morazova, K.M. Ruff, A.M. Sharma, X. Liu, M. Goodarzi, R.V. Pappu, D.W. Colby, H. Mirzaei, L.A. Joachimiak, and M.I. Diamond, *Inert and seed-competent tau monomers suggest structural origins of aggregation*. Elife, 2018. **7**.
87. Meisl, G., X. Yang, B. Frohm, T.P. Knowles, and S. Linse, *Quantitative analysis of intrinsic and extrinsic factors in the aggregation mechanism of Alzheimer-associated Abeta-peptide*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 18728.
88. Prusiner, S.B., *Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie*. Science, 1982. **216**(4542): p. 136-44.

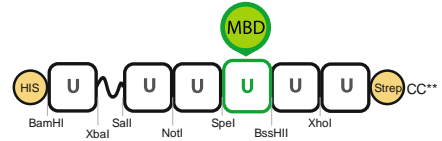
89. Kaufman, S.K., T.L. Thomas, K. Del Tredici, H. Braak, and M.I. Diamond, *Characterization of tau prion seeding activity and strains from formaldehyde-fixed tissue*. *Acta Neuropathol Commun*, 2017. **5**(1): p. 41.
90. Sharma, A.M., T.L. Thomas, D.R. Woodard, O.M. Kashmer, and M.I. Diamond, *Tau monomer encodes strains*. *Elife*, 2018. **7**.
91. Cummings, J., G. Lee, A. Ritter, and K. Zhong, *Alzheimer's disease drug development pipeline: 2018*. *Alzheimers Dement (N Y)*, 2018. **4**: p. 195-214.
92. Kametani, F. and M. Hasegawa, *Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease*. *Front Neurosci*, 2018. **12**: p. 25.
93. Bakota, L. and R. Brandt, *Tau Biology and Tau-Directed Therapies for Alzheimer's Disease*. *Drugs*, 2016. **76**(3): p. 301-13.
94. Elam, J.S., A.B. Taylor, R. Strange, S. Antonyuk, P.A. Doucette, J.A. Rodriguez, S.S. Hasnain, L.J. Hayward, J.S. Valentine, T.O. Yeates, and P.J. Hart, *Amyloid-like filaments and water-filled nanotubes formed by SOD1 mutant proteins linked to familial ALS*. *Nat Struct Biol*, 2003. **10**(6): p. 461-7.
95. Nelson, R., M.R. Sawaya, M. Balbirnie, A.O. Madsen, C. Riek, R. Grothe, and D. Eisenberg, *Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils*. *Nature*, 2005. **435**(7043): p. 773-8.
96. Sievers, S.A., J. Karanicolas, H.W. Chang, A. Zhao, L. Jiang, O. Zirafi, J.T. Stevens, J. Munch, D. Baker, and D. Eisenberg, *Structure-based design of non-natural amino-acid inhibitors of amyloid fibril formation*. *Nature*, 2011. **475**(7354): p. 96-100.
97. Seidler, P.M., D.R. Boyer, J.A. Rodriguez, M.R. Sawaya, D. Cascio, K. Murray, T. Gonen, and D.S. Eisenberg, *Structure-based inhibitors of tau aggregation*. *Nat Chem*, 2018. **10**(2): p. 170-176.
98. Vera, A.M. and M. Carrion-Vazquez, *Direct Identification of Protein-Protein Interactions by Single-Molecule Force Spectroscopy*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016. **55**(45): p. 13970-13973.
99. Neupane, K., A. Solanki, I. Sosova, M. Belov, and M.T. Woodside, *Diverse metastable structures formed by small oligomers of alpha-synuclein probed by force spectroscopy*. *PLoS One*, 2014. **9**(1): p. e86495.
100. Chwastyk, M., A. Galera-Prat, M. Sikora, A. Gomez-Sicilia, M. Carrion-Vazquez, and M. Cieplak, *Theoretical tests of the mechanical protection strategy in protein nanomechanics*. *Proteins*, 2014. **82**(5): p. 717-26.

Parte VIII

APÉNDICES

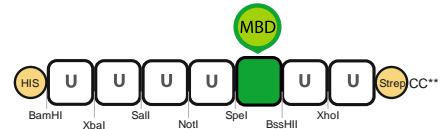
SECUENCIAS DE LOS VECTORES UTILIZADOS

pFS-2-MBD



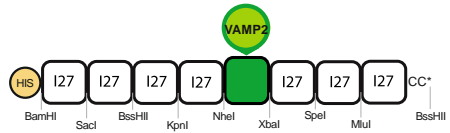
MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDRW**GS**MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLRGG**SR**DTEKIFPSAMSIEQINSLTVEPLKTL LAKPEGNYPQSSIEPPMHSYLT SVAEEVLSPEKTVSDTNREQRVTLQKQEAQSALILSQSLAEGHVESLQSPDVMISQVNYEPLVPSEHSCTEGGKILIESANPLENAGQDSAVRIEEGKSLRFPPLALEEKQVLLKKEHSDNVVMPDQIIIESKREPVAIKKVQEVQGRDLLSKESE**VD**MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLRGG**AA**AMQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLRGG**TS**MQIFVKTLTG**GTG**LQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLD FKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGN**PGTRGG**GKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLRGG**AR**MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLRGG**LE**MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLRGG**WSHPQFEK**CC**

pFS-2-c8C-MBD (N2B reemplazado por Ubi)



MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDRW**GS**MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLRGG**SR**MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLRGG**VD**MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLRGG**AA**AMQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLRGG**TS**MQIFVKTLTG**GTG**LQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLD FKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGN**PGTRGG**GKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLRGG**AR**MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLRGG**LE**MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLRGG**WSHPQFEK**CC**

pAFM-c8C-VAMP2



MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDRW**GS**LIEVEKPLYGVEVVFVGETAHFEIELSEPDV
 HGQWKLKGQPLAASPDCEI IEDGKKHILILHNCQLGMTGEVSFQAANTKSAANLKVKELRS**EL**LIE
 VEKPLYGVEVVFVGETAHFEIELSEPDVHGQWKLKGQPLAASPDCEI IEDGKKHILILHNCQLGMTG
 EVSFQAANTKSAANLKVKELRS**AR**LIEVEKPLYGVEVVFVGETAHFEIELSEPDVHGQWKLKGQPLA
 ASPDCEI IEDGKKHILILHNCQLGMTGEVSFQAANTKSAANLKVKELRS**GT**LIEVEKPLYGVEVVFV
 GETAHFEIELSEPDVHGQWKLKGQPLAASPDCEI IEDGKKHILILHNCQLGMTGEVSFQAANTKSA
 ANLKVKELRS**AS**LGVKIASVTGKTGDTITVPVTL SNVVKSGNVGTCNFYITYDASMLQAVSATAGD
 IVLNAPVNFSSINAT**GGTG**MSATAATVPPAAPAGEGGPPAPPNLT SNRRLQQTQAQVDEVVDIM
 RVNVDKVLERDQKLELDDRADALQAGASQFETSAAKLRKYWWKNLKP**PGTRGG**TGTISILFLD
 NTIGDQLITSDGVVANLTFKVVGTSSTTTPIAFKAGGAFGNGNMSKISDI TFTNGSAKLN**SR**LIEV
 EKPLYGVEVVFVGETAHFEIELSEPDVHGQWKLKGQPLAASPDCEI IEDGKKHILILHNCQLGMTGE
 VSFQAANTKSAANLKVKELRS**TS**LIEVEKPLYGVEVVFVGETAHFEIELSEPDVHGQWKLKGQPLAA
 SPDCEI IEDGKKHILILHNCQLGMTGEVSFQAANTKSAANLKVKELRS**TR**LIEVEKPLYGVEVVFV
 GETAHFEIELSEPDVHGQWKLKGQPLAASPDCEI IEDGKKHILILHNCQLGMTGEVSFQAANTKSAA
 NLKVKELRSCC***EF**

Secuencia nucleotídica de c8C

cttggagtaaagattgcttcagtaacaggtaaaaactggtgataactataacagtacctgta
actctgagcaatgttgttaaatacaggtaatgtaggaacatgtaatttctatattacatac
gatgcaagcatgctgcaggcagtatcagcaacagctggtgacatagtagtcaatgcacca
gttaacttctcaagcagcatcaacgcaacaactggtacaatcagtatccttttctggat
aacactataggtgatcagctcattaccagcgatggagtagttgctaactttacatttaaa
gtagtaggaacttcaagcacaacaactcctatcgcatttaagcaggcggagctttcggg
aatggaaacatgtctaaaatttctgatattacattcacaacggaagtgcaaaacttaat

Secuencia nucleotídica de c8C-MCS (negrita: sitio de clonaje múltiple)

cttggagtaaagattgcttcagtaacaggtaaaaactggtgataactataacagtacctgta
actctgagcaatgttgttaaatacaggtaatgtaggaacatgtaatttctatattacatac
gatgcaagcatgctgcaggcagtatcagcaacagctggtgacatagtagtcaatgcacca
gttaacttctcaagcagcatcaacgcaaca**GGTGAACCGGTCGTACGTCATCACCGGG**
ACGCGTGGAGGAactggtacaatcagtatccttttctggataaacactataggtgatcag
ctcattaccagcgatggagtagttgctaactttacatttaagtagtaggaacttcaagc
acaacaactcctatcgcatttaagcaggcggagctttcggtaatggaaacatgtctaaa
atttctgatattacattcacaacggaagtgcaaaacttaat

Chapter 1

Nanomechanics of Proteins, Both Folded and Disordered

Rubén Hervás, Albert Galera-Prat, Àngel Gómez-Sicilia, Fernando Losada-Urzáiz, María del Carmen Fernández, Débora Fernández-Bravo, Elena Santana, Clara Barrio-García, Carolina Melero, and Mariano Carrión-Vázquez

Hervás R, Galera-Prat A, Gómez-Sicilia A, Losada-Urzáiz F, **Fernández MC**, Fernández-Bravo D, Santana E, Barrio-García C, Melero C and Carrión-Vázquez M (2012) The nanomechanics of ordered and disordered proteins. In: Oberhauser A (eds) AFM studies on the mechanical properties of proteins. Springer-Verlag, Heidelberg. 1-47.

Se trata de una revisión general de nanomecánica de proteínas y aplicaciones de SMFS para el estudio de proteínas que presentan tanto un plegamiento definido como para IDPs (funcionales o patogénicas).

Con la participación en esta revisión, comencé a adquirir conceptos básicos sobre la Microscopía de Fuerza Atómica (técnica desconocida para mí hasta entonces) y sobre la nanomecánica de proteínas. Dado mi interés por la neurociencia en general, las enfermedades neurodegenerativas en particular y especialmente la agregación amiloidogénica causante de toxicidad, me centré en revisar secciones relacionadas con el análisis de IDPs.

Nanomechanics of Neurotoxic Proteins: Insights at the Start of the Neurodegeneration Cascade

Rubén Hervás^{*}, María del^{*} Carmen Fernández-Ramírez^{*}, Laura Esther Abelleira^{*}, Douglas V. Laurents[†] and Mariano Carrión-Vázquez^{*}

^{*}Instituto Cajal, IC-CSIC & Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain; [†]Instituto Madrileño de Estudios Avanzados en Nanociencia (IMDEA-Nanociencia), Cantoblanco, Madrid, Spain, [‡]Instituto de Química-Física Rocasolano, CSIC, Madrid, Spain

Hervás R, **Fernández-Ramírez MC**, Abelleira-Hervás L, Laurents DV and Carrión-Vázquez M (2014) Nanomechanics of neurotoxic proteins: insights at the start of the neurodegeneration cascade. In: Uversky, V.N. & Lyubchenko, A.K. (Eds.). *Bionanoimaging: Insights into Protein Misfolding and Aggregation*. Elsevier, Oxford.

Revisión específica sobre el uso de SMFS para el estudio de NPs y su posible uso como herramienta para comprobar la acción de potenciales agentes terapéuticos en el tratamiento de enfermedades amiloides.

Con una participación mucho más activa en la escritura de este capítulo, continué adquiriendo conceptos y visión crítica sobre los estudios de nanomecánica de IDPs. La revisión bibliográfica sobre el análisis de NPs por SMFS, me ayudó a tener una visión general de lo que se había hecho en el campo. De este modo, comencé a sentar las bases para poder participar en varios proyectos del laboratorio e iniciar los estudios presentados en esta tesis doctoral.

RESEARCH ARTICLE

Molecular Basis of Orb2 Amyloidogenesis and Blockade of Memory Consolidation

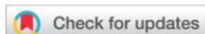
Rubén Hervás^{1,2}, Liying Li^{3,4}, Amitabha Majumdar^{3,5}, María del Carmen Fernández-Ramírez^{1,2}, Jay R. Unruh³, Brian D. Slaughter³, Albert Galera-Prat^{1,2}, Elena Santana¹, Mari Suzuki⁶, Yoshitaka Nagai^{6,7}, Marta Bruix⁸, Sergio Casas-Tintó¹, Margarita Menéndez^{8,9}, Douglas V. Laurents⁸, Kausik Si^{3,4*}, Mariano Carrión-Vázquez^{1,2*}

1 Instituto Cajal, IC-CSIC, Madrid, Spain, **2** Instituto Madrileño de Estudios Avanzados en Nanociencia (IMDEA-Nanociencia), Madrid, Spain, **3** Stowers Institute for Medical Research, Kansas City, Missouri, United States of America, **4** Department of Molecular and Integrative Physiology, University of Kansas Medical Center, Kansas City, Kansas, United States of America, **5** National Brain Research Centre, Manesar, Guragon, Haryana, India, **6** Department of Degenerative Neurological Diseases, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Kodaira, Tokyo, Japan, **7** Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST), Japan Science and Technology Agency, Saitama, Japan, **8** Instituto de Química-Física Rocasolano, IQFR-CSIC, Madrid, Spain, **9** Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Respiratorias, Madrid, Spain



Hervás R, Li L, Majumdar A, **Fernández-Ramírez MC**, Unruh JR., Slaughter BD, Galera-Prat A, Santana E, Suzuki M, Nagai Y, Bruix M, Casas-Tintó S, Menéndez M, Laurents DV, Si K and Carrión-Vázquez M (2016) Molecular basis of Orb2 amyloidogenesis and blockade of memory consolidation. *PLoS biology*, 14(1), e1002361.

Mi participación en este artículo consistió en la generación y producción de algunas de las proteínas recombinantes utilizadas, así como experimentos *in vitro* relacionados con el testado y análisis del carácter amiloidogénico de Orb2. Las técnicas utilizadas aparecen también en la presente tesis, por lo que la implicación en este artículo contribuyó al desarrollo de las habilidades necesarias para llevar a cabo el trabajo aquí presentado. El estar involucrada en este proyecto despertó mi interés sobre el amiloide funcional y las características que determinan el carácter fisiológico/patológico de una proteína amiloide. Pude participar y estar presente en discusiones que tratan estas preguntas, tanto con compañeros de mi laboratorio, como con el colaborador el Dr. Kausik Si en la *Gordon Research Conference* “Neurobiology of Brain Disorders” celebrada en Girona en 2014.



Efficient and simplified nanomechanical analysis of intrinsically disordered proteins†

Cite this: *Nanoscale*, 2018, **10**, 16857

María del Carmen Fernández-Ramírez,^a Rubén Hervás,^a Albert Galera-Prat,^{id}^a
Douglas V. Laurents^{id}^b and Mariano Carrión-Vázquez^{id}^{*a}

Fernández-Ramírez MC, Hervás R, Galera-Prat A, Laurents DV and Carrión-Vázquez M (2018) Efficient and simplified nanomechanical analysis of intrinsically disordered proteins. *Nanoscale*, 10(35):16857-16867

Este es mi primer artículo como primera autora y que constituye el segundo bloque de la tesis. Este proyecto me ha dado la oportunidad de recorrer todos los estadios de un artículo científico: desde la concepción de la idea, pasando por la ejecución y análisis de experimentos y, finalmente, la escritura del manuscrito. De esta manera, he conseguido adquirir una visión global acerca de cómo desarrollar un proyecto de investigación y poder así optar al grado de doctora.