



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Detección de la proteína Tau, marcador de la enfermedad de Alzheimer, en gránulos de estrés en *Saccharomyces cerevisiae*”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Sandra Angélica Blancas Mejía

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Roberto Coria Ortega
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Ismael Bustos Jaimes
[Facultad de Medicina](#)
Dr. José Francisco Torres Quiroz
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Ciudad de México. Mayo, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Blancas Mejía Sandra Angélica
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del 16 de agosto del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Maestra en Ciencias**, con la réplica de la tesis "**Detección de la proteína Tau, marcador de la enfermedad de Alzheimer, en gránulos de estrés en Saccharomyces cerevisiae**", dirigida por el/la Dr(a). **Coría Ortega Roberto**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Arias Álvarez Ana Brígida Clorinda
VOCAL	Peraza Reyes Carlos Leonardo
VOCAL	Sánchez Nieto Sobeida
VOCAL	Pérez Martínez Xochitl
SECRETARIO	Navarro González Rosa Estela

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 16 de agosto de 2021
COORDINADORA



Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz

Apoyos y agradecimientos

PAPIIT, DGAPA, UNAM: Proyecto No: IN210519
Folio de beca: 040621
CONACyT: Proyecto No. CF-58550
Posgrado en Ciencias Bioquímicas
PAEP
CONACyT Becario No: 967530
Número de Apoyo: 736290

Agradecimiento a la ayuda técnica de:

Laura Kawasaki Watanabe
Diana Chávez García
Yaisa Castillo Casaña

Al personal de la Unidad de Biología Molecular

Laura Ongay Larios
Guadalupe Codiz Huerta
Minerva Mora Cabrera

Al personal de la Unidad de Cómputo

Gerardo Coello Coutiño
Ana María Escalante Monsalvo
Juan Manuel Barbosa
Ivette Rosas Arciniega

Al personal del Taller de Mantenimiento:

Ing. Manuel Ortíz Benavides
Ing Aurey Galván Lobato

Al Dr. Jesús Aguirre Linares

Olivia Sánchez
Daniela Campiño Arias, por el préstamo del microscopio de epifluorescencia y todas las facilidades brindadas

Al comité tutor

Dr. Ismael Bustos Jaimes
Dr. José Francisco Torres Quiroz

Índice de contenido

	Página
Índice de figuras	<i>I</i>
Índice de tablas.....	<i>II</i>
Abreviaturas.....	<i>III</i>
Resumen	<i>IV</i>
1 Introducción.....	1
1.1 Expresión y estructura de la proteína Tau	1
1.1.1 El gen MAPT.....	1
1.1.2 Isoformas de Tau.....	1
1.1.3 Filogenética Tau	3
1.1.4 Dominios y estructura de Tau.....	4
1.1.5 Modificaciones postraduccionales de Tau	5
1.1.5.1 Fosforilación de Tau	6
1.1.6 Tau en la fisiología normal	6
1.2 Patología por Tau	7
1.2.1 Taupatías.....	7
1.2.2 Enfermedad de Alzheimer	9
1.3 Gránulos de estrés	10
1.3.1 Composición y dinámica de los gránulos de estrés	10
1.3.2 Formación de los gránulos de estrés	11
1.3.3 Gránulos de estrés en levadura	14
1.3.4 TIA-1/Pub1 en los gránulos de estrés	19
1.3.5 Gránulos de estrés y neurodegeneración	20
1.3.6 Tau y los gránulos de estrés	21
2 Justificación	23
3 Hipótesis	25
4 Objetivos	26
4.1 Objetivo general.....	26
4.2 Objetivos particulares	26
5 Materiales y métodos.....	27
5.1 Esquema general de trabajo.....	27
5.2 Cepas y plásmidos	28
5.3 Condiciones de cultivo.....	28
5.4 Transformación de levaduras	28
5.5 Expresión de Tau en levadura.....	29
5.6 Inducción de la formación de gránulos de estrés	29

5.6.1	Privación de glucosa o ayuno.....	30
5.6.2	Choque térmico	30
5.6.3	Estrés hiperosmótico	30
5.7	Observación de la formación de gránulos de estrés	31
5.8	Ensayo de reversibilidad y desensamblaje de los gránulos de estrés.....	31
6	Resultados	32
6.1	Expresión de Tau en levadura y formación de gránulos de estrés por privación de glucosa	32
6.2	Colocalización de Tau en mitocondria	32
6.3	Efecto de otros tipos de estrés en la acumulación de Tau en posibles SG	35
6.4	Reversibilidad y desensamblaje de los gránulos de estrés	37
7	Discusión	40
8	Conclusiones	45
9	Perspectivas	46
10	Referencias	47

Índice de figuras

	Página
Figura 1 Descripción general de la organización genómica del gen MAPT y la expresión de las isoformas de Tau.....	2
Figura 2 Dominios y predicción de regiones desordenadas de la proteína Tau humana de longitud completa	5
Figura 3 Regulación del ensamblaje de los gránulos de estrés	13
Figura 4 Fases del ciclo de los gránulos de estrés.....	15
Figura 5 Esquema general de trabajo.....	27
Figura 6 Inducción de gránulos de estrés por privación de glucosa en células de <i>S. cerevisiae</i> que expresan la isoforma de Tau 2N4R marcada con la proteína verde fluorescente (GFP).	33
Figura 7 Co-localización de Tau en la mitocondria en condiciones de estrés por ayuno en agua.	34
Figura 8 Efecto de diferentes condiciones de estrés en la acumulación de Tau en posibles gránulos de estrés.	36
Figura 9 Ensayo de reversibilidad y desensamblaje de los gránulos en las células sometidas a estrés por privación de glucosa.	38
Figura 10 Ensayo de reversibilidad y desensamblaje de los gránulos en las células sometidas a estrés por agotamiento de fuente de carbono	39

Índice de tablas

	Página
Tabla 1 Clasificación de taupatías de acuerdo al patrón predominante de las isoformas de Tau	8
Tabla 2 Resumen de las vías de inhibición de la traducción que conducen a la formación de gránulos de estrés.....	12
Tabla 3 Características de los gránulos de estrés en <i>S. cerevisiae</i> inducidos por diferentes condiciones de estrés.	16
Tabla 4 Diferencias entre los gránulos de estrés de mamíferos y de levadura.....	18
Tabla 5 Cepas y plásmidos utilizados.....	28
Tabla 6 Efecto de las diferentes condiciones de estrés en la formación de los gránulos de estrés.....	35

Abreviaturas

15d-PGJ2	15-desoxi-(12,14)-prostaglandina J2	MARK	Cinasa reguladora de la afinidad por microtúbulos
2N4R	Isoforma más larga de Tau	MTBR	Del inglés, <i>microtubule binding repeat domain</i>
AGD	Enfermedad del grano argirofílica	mTOR	Diana de la rapamicina en mamíferos
ALS	Esclerosis lateral amiotrófica	Na2SeO3	Selenito de sodio
APP	Proteína precursora del péptido β amiloide	NaAsO2	Arsenito de sodio
ARN	Ácido ribonucleico	NaCl	Cloruro de sodio
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero	NTFs	Ovillos neurofibrilares intracelulares, del inglés <i>neurofibrillary tangles</i>
ARTAG	Astroglíopatía Tau relacionada con el envejecimiento	ONP	Proteína naranja fluorescente
ATP	Adenosín trifosfato	PABP	Proteína de unión a poli(A)
ATXN-2	Ataxina 2	Pbp1	Proteína de unión a PAB1
Aβ	Péptido β amiloide	PEG	Polietilenglicol
CBD	Degeneración corticobasal	PERK	PKR-cómo retículo endoplásmico cinasa
Cdk5	Cinasa dependiente de ciclina 5	PHFs	Filamentos helicoidales pareados, del inglés <i>paired helical filaments</i>
CTE	Encefalopatía traumática crónica	PIC	Complejos de pre-iniciación
DMSO	Dimetilsulfóxido	PiD	Enfermedad de Pick
EA	Enfermedad de Alzheimer	PKA	Proteína cinasa A
EGP	Acrónimo utilizado para describir eIF4E, eIF4G y Pabp1	PKI	Proteína cinasa I de Tau
eIF2α	Subunidad alfa del factor 2 de iniciación de la traducción eucariota	PKR	Proteína cinasa R
eIF3	Factor 3 de iniciación de la traducción eucariota	PP1	Proteína fosfatasa 1
eIF4F	Complejo de unión a cap	PP2A	Proteína fosfatasa 2
EWSR1	Del inglés, <i>EWS RNA binding protein 1</i>	PP2B	Calcineurina
FMRP	Síndrome X frágil	PP5	Proteína fosfatasa 5
FTD	Demencia frontotemporal	PrLD	Dominios similares a priones
FTDP-17	Demencia frontotemporal y parkinsonismo ligados al cromosoma 17	PS	Placas seniles
G3BP1	Proteína 1 de unión a la proteína activadora de Ras GTPasa	PSP	Parálisis supranuclear progresiva
GAL1	Promotor de galactosa	Pub1	Proteína de unión a poliU
GCN2	Cinasa control general no depresible 2	RBPs	Proteínas de unión al ARN, del inglés <i>RNA-binding proteins</i>
GFP	Proteína verde fluorescente	RE	Retículo endoplásmico
GSK-3	Glucógeno sintasa cinasa 3	RNPs	Ribonucleoproteínas
H1	Haplotipo 1	ROS	Especies reactivas de oxígeno
H2	Haplotipo 2	RRM	Motivos de reconocimiento a ARN, del inglés <i>RNA recognition motif</i>
H₂O	Agua	SD	Medio mínimo sintético
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno	SF	Filamentos rectos, del inglés <i>straight filaments</i>
His	Histidina	SG	Gránulos de estrés, del inglés <i>stress granules</i>
hnRNPA0	Del inglés, <i>Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A0</i>	SGal	Medio sintético con galactosa

Abreviaturas

hnRNPA1	Del inglés, <i>Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1</i>	SRaf	Medio sintético con rafinosa
hnRNPA2B1	Del inglés, <i>Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein 2B1</i>	Sup35	Proteína Sup35, factor de terminación eRF3
HRI	Cinasa eIF2- α regulada por el grupo hemo	TDP43	Del inglés, <i>TAR DNA-binding protein 43</i> o <i>transactive response DNA binding protein 43 kDa</i>
IDR	Dominios intrínsecamente desordenados	TIA-1	Antígeno intracelular 1 de células T
JNK	Cinasa aminoterminal de C-Jun	TIAR	Relacionado con TIA-1
KCl	Cloruro de potasio	TPKII	Proteína cinasa II de Tau
LCD	Dominio de baja complejidad	TTP	Triestraprolina
LiOAc	Acetato de litio	Ubp3	Proteasa de ubiquitina 3
LLPS	Separación de fase líquido-líquido	Ura	Uracilo
MAP2	Del inglés, <i>Microtubule Associated Protein 2</i>	USP10	Peptidasa10 específica de ubiquitina
MAP4	Del inglés, <i>Microtubule Associated Protein 4</i>	YPD	Medio completo, del inglés <i>Yeast extract Peptone Dextrosa</i>
MAPT	Del inglés, <i>Microtubule Associated Protein Tau</i>	YPGal	Medio completo con galactosa

Resumen

La proteína Tau es el componente principal de los ovillos neurofibrilares intracelulares (NTFs), los cuales junto con las placas seniles extracelulares de péptido β amiloide ($A\beta$) son características patológicas principales de la enfermedad de Alzheimer (EA). La proteína Tau se localiza principalmente en los axones de las neuronas, donde su función canónica es estabilizar la dinámica de los microtúbulos (Arendt *et al.*, 2016). Sin embargo, en la EA, como en condiciones de estrés, Tau se fosforila, se oligomeriza, y se acumula en el compartimento somatodendrítico, donde puede interactuar con proteínas de unión al ARN (RBPs) que promueven la formación de gránulos de estrés (SG) (Cruz *et al.*, 2019).

Los gránulos de estrés son complejos citoplasmáticos sin membrana, compuestos por RBPs y ARNm, que se ensamblan bajo condiciones de estrés. La formación de los SG es una estrategia celular conservada en los eucariotas, para reducir el daño relacionado con el estrés y promover la supervivencia celular, deteniendo la traducción del ARNm y almacenándolo temporalmente, junto con otras proteínas, en los SG, para así, favorecer la síntesis de proteínas citoprotectoras (Baradaran-Heravi *et al.*, 2020; Kedersha *et al.*, 2005).

Estudios de patología molecular de casos humanos con EA mostraron colocalización de Tau (hiperfosforilada o mal plegada) con RBPs asociadas a SG, en particular con la proteína TIA-1, encargada de formar los núcleos de los SG (Vanderweyde *et al.*, 2012). Así como también en modelos animales de la tauopatía, donde se demostró que TIA-1 interacciona con Tau e induce la formación de SG que contienen Tau (Apicco *et al.*, 2018; Maziuk *et al.*, 2018; Vanderweyde *et al.*, 2016).

La levadura no tiene un ortólogo de Tau, no obstante, la proteína Tau humana se ha expresado en células de *S. cerevisiae* y estos estudios de Tau en modelo de levadura han ayudado a comprender mejor la relación entre la hiperfosforilación de Tau, la agregación y la unión de microtúbulos (Chernoff *et al.*, 2020). Sin embargo, la asociación de Tau a los SG en modelo de levadura, no ha sido estudiada hasta el momento.

Por tal motivo, el objetivo de este proyecto consistió en determinar si la isoforma larga de Tau (2N4R), expresada de forma heteróloga en *S. cerevisiae*, se agrega y se asocia a SG, cuando las células se exponen a diferentes condiciones de estrés.

Nuestros resultados indican que las células de *S. cerevisiae* con la isoforma 2N4R de la proteína Tau humana expresada heterológamente y sometidas a diferentes condiciones de estrés, tales como la privación de glucosa, el estrés hiperosmótico, el estrés por calor y por frío, estimularon la acumulación de Tau en agregados o condensados citoplasmáticos consistentes con SG.

Introducción

1.1 Expresión y estructura de la proteína Tau

1.1.1 El gen MAPT

La proteína Tau asociada a microtúbulos está codificada por un solo gen, el gen MAPT (del inglés, *Microtubule Associated Protein Tau*) que se encuentra en el cromosoma 17 en el locus 17q21.31 y consta de 16 exones (Figura 1). Tau se expresa en diferentes isoformas debido al empalme alternativo de su pre-ARNm (Neve *et al.*, 1986; Goedert *et al.*, 1989b).

La proteína Tau se expresa ampliamente en el sistema nervioso central y periférico, pero también está presente en riñones, pulmones y testículos. A nivel neuronal Tau es más abundante en los axones, aunque también se le encuentra en los compartimentos somatodendríticos (Tashiro *et al.*, 1997), y dentro del núcleo se encuentra asociada con el nucléolo (Loomis *et al.*, 1990).

1.1.2 Isoformas de Tau

En el cerebro humano, los exones 2, 3 y 10 de Tau se empalman alternativamente, dando lugar a seis isoformas diferentes (Goedert *et al.*, 1989b). Otras isoformas presentes en el sistema nervioso periférico se generan por el empalme de los exones 4A y 6. Estas isoformas se denominan "Tau grande" por su alto peso molecular (Couchie *et al.*, 1992), y difieren por la presencia o ausencia de uno o dos insertos de 29 aminoácidos (0N, 1N, 2N) en el extremo amino-terminal, codificados por los exones 2 y 3.

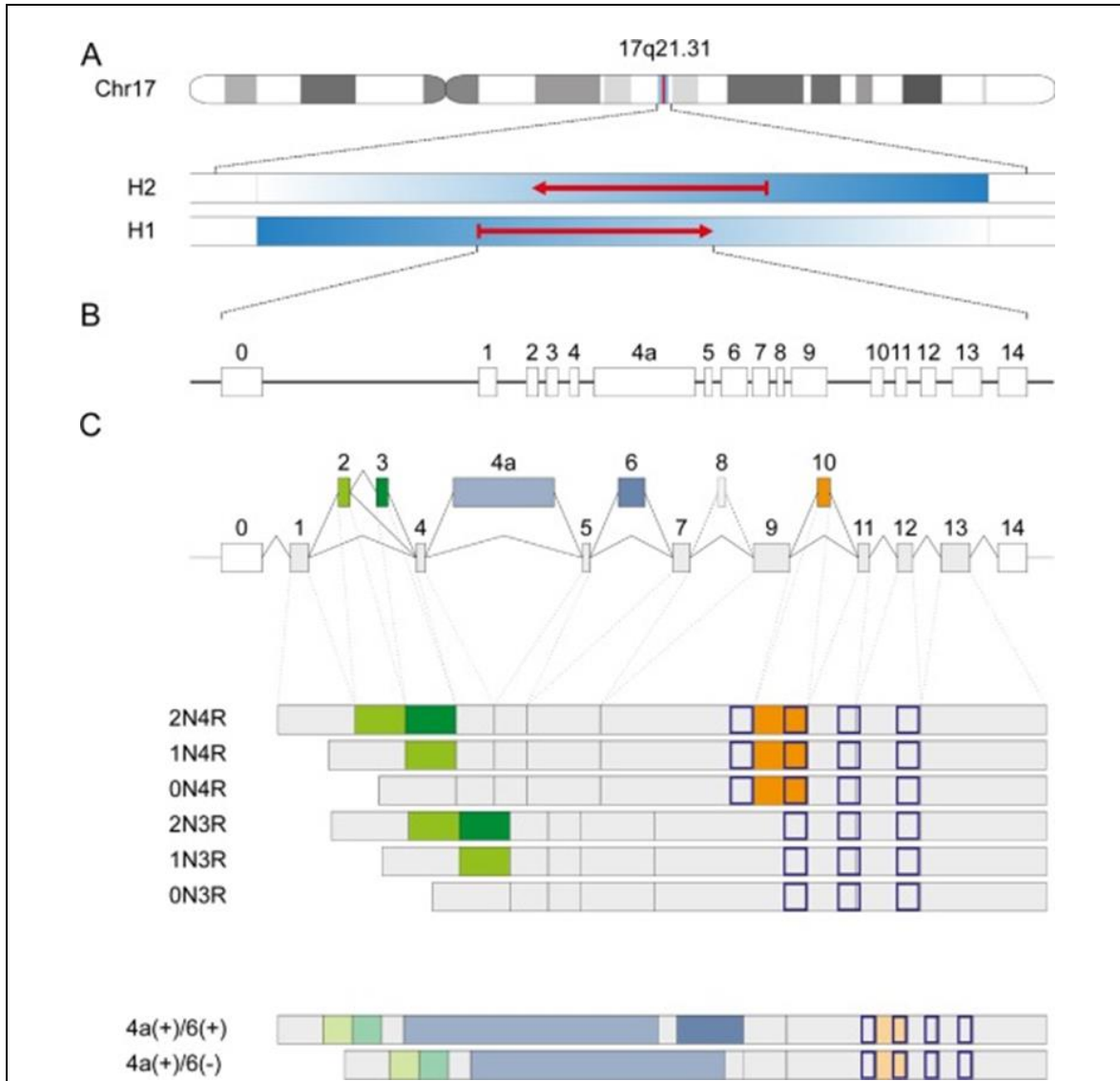


Figura 1. Descripción general de la organización genómica del gen MAPT y la expresión de las isoformas de Tau. (A) El gen MAPT se encuentra en el brazo largo del cromosoma 17 en la posición 17q21.31. Existen dos haplotipos, denominados H1 y H2, debido a un polimorfismo de inversión de ≈ 900 kb. (B) El gen Tau comprende 16 exones. El codón de inicio y finalización se encuentran en los exones 1 y 13, respectivamente. (C) En el sistema nervioso central, los exones 2, 3 y 10 se empalman alternativamente. El exón 3 se encuentra solo junto con el exón 2. El exón 10 codifica una de las cuatro repeticiones de unión de microtúbulos en total (recuadros de color azul oscuro). Por lo tanto, la presencia de los exones 2, 3 y 10 respectivamente, da lugar a 6 isoformas caracterizadas por la ausencia de (0N), o presencia de uno (1N) o dos (2N) insertos amino-terminales en combinación con tres (3R) o cuatro (4R) repetidos de unión a microtúbulos. Las principales isoformas de Tau expresadas en el sistema nervioso periférico contienen además el exón 4a solo o en combinación con el exón 6. Sin embargo, el empalme alternativo de los exones 2, 3 y 10 en el sistema nervioso periférico no se ha analizado hasta ahora. Hasta la fecha no hay evidencia de una isoforma de Tau que contenga el exón 8 (modificada de Arendt *et al.*, 2016).

Las isoformas también difieren por la presencia y la combinación de tres o cuatro dominios de unión a microtúbulos, que consisten en repetidos de 31 aminoácidos altamente conservados (3R o 4R) y que se encuentran en la región C-terminal. Estos dominios están codificados por los exones del 9 al 12.

El exón 10, en particular, codifica para el segundo de cuatro dominios de unión a microtúbulos, por lo que su inclusión da como resultado la producción de tres isoformas con cuatro repeticiones (4R) y su exclusión genera otras tres isoformas con tres repeticiones (3R). El corte y empalme alternativo del exón 10 es de particular interés, ya que está asociado con distintas taupatías (Spillantini *et al.*, 1998).

La expresión de las isoformas de Tau está regulada durante el desarrollo. La isoforma más corta se expresa en el cerebro fetal y gradualmente se expresan múltiples isoformas durante el desarrollo mediante la inclusión de los exones 2, 3 y 10. En el cerebro humano adulto, se expresan niveles similares de Tau 3R y 4R. Esta proporción es importante, porque las mutaciones que alteran esta proporción inducen taupatías (Goedert y Jakes, 1990).

1.1.3 Filogenética de Tau

La proteína Tau pertenece a la familia MAP2/Tau de proteínas asociadas a microtúbulos, que incluye a las proteínas de vertebrados MAP2, MAP4, Tau y homólogos de otros animales. Las tres proteínas de vertebrados tienen formas de empalme alternativas y comparten un dominio C-terminal conservado que contiene dominios de unión a microtúbulos y un dominio de proyección amino-terminal de tamaño variable. En los mamíferos, MAP2 y Tau se expresan normalmente en las neuronas, mientras que MAP4 también se expresa fuera del SNC (Dehmelt y Halpain, 2005).

La proteína ZipA de *Escherichia coli*, que muestra una homología limitada con MAP2/Tau se ha sugerido que es un prototipo antiguo de la familia MAP/Tau (RayChaudhuri, 1999).

Los ortólogos funcionales de MAP2/Tau, que contienen dominios de unión a microtúbulos, se encuentran en *Caenorhabditis elegans* (PTL-1) (Goedert *et al.*, 1996a), en *Drosophila melanogaster* (CG31057) (Heidary y Fortini, 2001), y se encontró un gen relacionado con Tau (CAGO3O2O) en *Tetraodon* (pez globo) (Dehmeltand Halpain, 2005). Sin embargo, no se han encontrado homólogos en eucariotas fuera de los animales (Sündermann *et al.*, 2016).

1.1.4 Dominios y estructura de Tau

La proteína Tau es una proteína altamente soluble, se encuentra desplegada de forma nativa y contiene un bajo contenido de estructuras secundarias, por lo cual se le considera como una proteína “intrínsecamente desordenada” (Mukrasch *et al.*, 2009).

De acuerdo a la secuencia primaria y a las interacciones funcionales, se pueden distinguir cuatro dominios principales de Tau: un dominio de proyección N-terminal, una región rica en prolina, un dominio de repetidos de unión a microtúbulos MTBR (del inglés, *microtubule binding repeat domain*) y un dominio C-terminal básico (Figura 2).

La unión a los microtúbulos ocurre a través de los dominios repetidos R1-R4 (Mukrasch *et al.*, 2005). El dominio rico en prolina está involucrado en la señalización celular, es blanco de muchas proteínas cinasas dirigidas por prolina y contiene sitios de unión para proteínas con dominios SH3.

El dominio N-terminal se proyecta lejos de la superficie de los microtúbulos cuando Tau se une a estos y se cree que actúa como un espaciador para mantener separados a los microtúbulos. Puede interactuar con componentes de la membrana plasmática, con mitocondrias y con otros elementos del citoesqueleto (Goedert y Spillantini, 2019).

La región C-terminal desempeña un papel en la regulación de la capacidad de Tau para inducir la polimerización de los microtúbulos y en su interacción con la membrana plasmática (Arendt *et al.*, 2016).

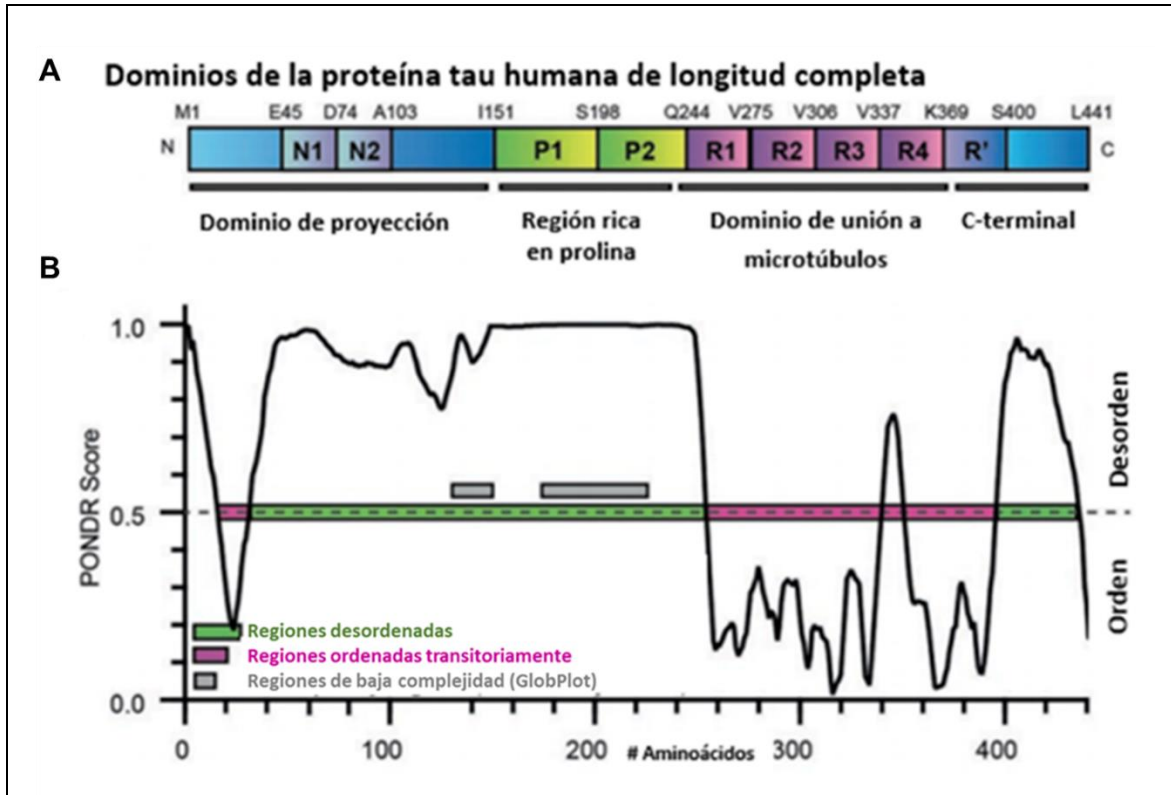


Figura 2. Dominios y predicción de regiones desordenadas de la proteína Tau humana de longitud completa. (A) Secuencia y estructura de los dominios de la isoforma cerebral más larga de Tau humana (2N4R; 441 aminoácidos), que, contiene dos inserciones (N1 y N2) en el dominio de proyección N-terminal y cuatro pseudo-repeticiones (R1-R4) en la mitad C-terminal. Las repeticiones R1-R4, pequeñas partes de la región rica en prolina P2 y la región R', están involucradas en la unión de microtúbulos, mientras que la mitad N-terminal no estructurada se proyecta desde la superficie de los microtúbulos. (B) Predicción de regiones desordenadas para Tau de longitud completa (2N4R; <http://www.pondr.com/>) que muestra que el dominio de proyección, el dominio rico en prolina (P1 + P2) y el extremo C-terminal están en su mayoría desordenados (regiones verdes en la línea horizontal media), mientras que se predice alguna estructura secundaria para el dominio de repetición (R1 a R4 y R'; regiones rosadas en la línea media). Las regiones de baja complejidad predichas (barras grises; <http://globplot.embl.de/>) resultan principalmente de un alto contenido de prolina (modificada de Wegmann *et al.*, 2019).

1.1.5 Modificaciones postraduccionales de Tau

La proteína Tau es una fosfoproteína y su unión a los microtúbulos se regula por la fosforilación de residuos de serina y treonina presentes en las regiones MTBR, así como en sitios inmediatamente adyacentes a ellas (Arendt *et al.*, 2016).

Tau puede sufrir una serie de modificaciones postraduccionales como acetilación, nitración, metilación, desamidación, ubiquitinización, sumoilación, glicación, oxidación, glicosilación y poliaminación, las cuales parecen reducir la afinidad de Tau por los microtúbulos y pueden llevar a una acumulación intraneuronal de esta proteína (Martin *et al.*, 2011).

1.1.5.1 Fosforilación de Tau

La modificación más estudiada de Tau es su fosforilación. El estado de fosforilación de esta proteína depende del equilibrio entre las actividades de diferentes proteínas cinasas y fosfatasas. Tau puede ser fosforilada por múltiples enzimas y se han identificado 45 sitios de fosforilación (Hanger *et al.*, 2009). Se han reportado una serie de cinasas capaces de fosforilar a Tau, como la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK-3), la cinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5), la cinasa reguladora de la afinidad por microtúbulos (MARK), la proteína cinasa A (PKA), la cinasa aminoterminal de C-Jun (JNK), y las proteínas cinasas de Tau I y II (PKI, TPKII), entre las principales. De igual forma se conocen una serie de proteínas fosfatasas capaces de defosforilar a Tau, entre las que se encuentran la calcineurina (PP2B) y las proteínas fosfatasas 1, 2 y 5 (PP1, PP2A, y PP5). Entre éstas, la PP2A es la fosfatasa principal en el cerebro humano (Arendt *et al.*, 2016).

La fosforilación juega un papel crucial en la regulación de las funciones de Tau, incluida su unión a los microtúbulos. La hiperfosforilación de Tau está implicada en numerosas formas de taupatías, entre ellas la enfermedad de Alzheimer (EA).

1.1.6 Tau en la fisiología normal

Tau es una proteína multifuncional, sin embargo, regular y mantener la estructura de los microtúbulos se considera su función canónica. En el cerebro adulto, Tau se encuentra

predominantemente en el axón, donde se une a la tubulina promoviendo su polimerización y regulando la estabilidad de los microtúbulos y el espaciado entre éstos en el axón.

El seguimiento de una sola molécula demostró que la interacción de Tau con los microtúbulos es un proceso altamente dinámico, con un tiempo de interacción muy corto, de menos de 40 ms de permanencia de Tau en un solo microtúbulo, antes de que salte al siguiente. La breve interacción de Tau con los microtúbulos suprime la disociación rápida natural de los dímeros de tubulina en la punta de los microtúbulos. A éste mecanismo de interacción de Tau con los microtúbulos se le conoce como “beso y salto” (Janning *et al.*, 2014).

Además de regular la dinámica y la estructura de los microtúbulos, Tau participa en la regulación de la estabilidad del genoma en el núcleo, interacciona con el citoesqueleto de actina y puede regular el transporte axonal (Wang y Mandelkow, 2016; Arendt *et al.*, 2016).

1.2 Patología por Tau

1.2.1 Taupatías

La mayoría de las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por agregados intracelulares de proteínas insolubles. La proteína Tau puede formar depósitos fibrilares intracelulares en neuronas y células gliales que se asocian a una gran variedad de trastornos que se conocen colectivamente como taupatías. Las taupatías comprenden más de 20 trastornos, que incluyen a la enfermedad de Alzheimer (EA), la parálisis supranuclear progresiva (PSP), la demencia frontotemporal (FTD), la degeneración corticobasal (CBD), la enfermedad de Pick (PiD), la encefalopatía traumática crónica (CTE), y la enfermedad del grano argirofílica (AGD), entre otras (Arendt *et al.*, 2016; Kovacs, 2016).

Las características comunes de las taupatías son la hiperfosforilación de Tau (Köpke *et al.*, 1993) y su redistribución desde el compartimento axonal al somatodendrítico (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986a, b; Kowall y Kosik, 1987), así como la formación de agregados en fibrillas que se acumulan en neuronas y en algunos casos, en astrocitos. Sin embargo, las diversas

patologías difieren en el patrón de expresión de las isoformas de Tau, en el grado de su fosforilación y en la conformación de filamentos; además pueden también diferir en la distribución celular de Tau, ya sea en neuronas, astrocitos y/o oligodendrocitos, y en las características anatómicas que influyen en el fenotipo clínico de estas enfermedades (Kovacs, 2016). Estas diferentes características de las taupatías se han utilizado para su mejor clasificación.

Una de las clasificaciones más usadas se basa en la proporción de las isoformas 3R y 4R de Tau (Tabla 1), con la cual se pueden distinguir cuatro clases diferentes (Spillantini y Goedert, 1998; Williams, 2006; Kovacs, 2016).

En las taupatías de Clase I, las seis isoformas de Tau están presentes en proporciones similares y presentan tres repeticiones 3R y cuatro repeticiones 4R. Las taupatías de clase II están compuestas principalmente de isoformas 4R; las de clase III contienen preferentemente isoformas 3R y finalmente las de clase IV presentan isoformas que carecen de secuencias codificadas por los exones 2, 3 y 10 (Arendt *et al.*, 2016).

Tabla 1. Clasificación de taupatías de acuerdo al patrón predominante de las isoformas de Tau.

Clase I 3R+4R	Clase II 4R	Clase III 3R	Clase IV 0N3R
Enfermedad de Alzheimer Síndrome de Down Parkinsonismo-demencia complejo de Guam Enfermedad de Niemann-Pick tipo C Encefalopatía traumática crónica Algunos casos de demencia frontotemporal y parkinsonismo ligados al cromosoma 17 (FTDP-17)	Parálisis supranuclear progresiva Degeneración corticobasal Enfermedad de grano argirófilica Taupatía glial globular Astrogliopatía Tau relacionada con el envejecimiento (ARTAG) y algunos casos con lesiones FTDP-17	Enfermedad de Pick Algunos casos de (FTDP-17)	Distrofia miotónica

(Modificada de Arendt *et al.*, 2016).

A pesar de una intensa investigación, los mecanismos moleculares de la neurodegeneración producida por Tau siguen sin estar claros. En las taupatías familiares, varias mutaciones en el gen MAPT parecen ser la causa de la agregación de Tau, pero en las taupatías esporádicas (como la EA), aun no se conoce. La pérdida de función de Tau,

la ganancia de su función tóxica y su localización incorrecta son las causas más comunes de neurodegeneración (Wang y Mandelkow, 2016).

La EA es el prototipo de las taupatías, debido a que se han correlacionado algunas modificaciones postraduccionales de Tau con ciertos procesos de degeneración neurofibrilar (Williams, 2006; Kovacs, 2016).

1.2.2 Enfermedad de Alzheimer

La EA es la enfermedad neurodegenerativa más común en todo el mundo y la principal causa de demencia. Se espera que el número de personas afectadas aumente a más de 150 millones en 2050 (Tiwari *et al.*, 2018). Sus manifestaciones clínicas incluyen cambios graduales cognitivos, conductuales y pérdida de la memoria. La EA se produce como resultado de la muerte de las células neuronales y la pérdida temprana de sinapsis.

La EA generalmente se considera una enfermedad multifactorial y tiene formas familiares y esporádicas. La forma más común de la EA es la esporádica de inicio tardío (65 años), mientras que los casos hereditarios de inicio temprano (entre 30 y 65 años) representan aproximadamente el 1% de todos los casos (Falcon *et al.*, 2018).

Los ovillos neurofibrilares (NFTs, del inglés *neurofibrillary tangles*), y las placas seniles (PS) son las características neuropatológicas más comunes de la EA. Las PS son agregados extracelulares compuestos del péptido β -amiloide ($A\beta$), que se escinden del precursor de la proteína del amiloide (APP, del inglés *amyloid precursor protein*) (Tiwari *et al.*, 2019). Los NFTs son estructuras intraneuronales, que se componen principalmente de la proteína Tau asociada a los microtúbulos. Los ovillos neurofibrilares se producen a partir de formas de Tau modificadas post-traduccionalmente, siendo la más común la hiperfosforilación (Hasegawa, 2019).

En la EA, como en otras taupatías, Tau se encuentra hiperfosforilada y presenta una conformación más plegada que es propensa a agregarse. La proteína Tau hiperfosforilada se autoagrega y se polimeriza en estructuras cada vez mayores dando origen a filamentos

helicoidales pareados (PHFs, del inglés *paired helical filaments*) y a filamentos rectos (SF, del inglés *straight filaments*) que forman los ovillos neurofibrilares. La estructura secundaria de hélices β es la estructura predominante en los PHFs y en los NFTs. La proteína Tau no hiperfosforilada tiene una estructura flexible, en contraste, la forma hiperfosforilada es insoluble y se encuentra mal plegada y progresivamente adquiere una conformación rígida que da lugar a la formación de los NFTs (Falcon *et al.*, 2018).

El modelo más simple para la generación de los NFTs es el ensamblaje a partir de monómeros de Tau libre y/o oligómeros de Tau en el citosol.

El mecanismo preciso de la formación de los NFTs aún no se entiende por completo, y no se sabe si los ovillos son un factor causal de la enfermedad, ya que se ha sugerido que la especie más tóxica de Tau es la forma oligomérica soluble y no el ovillo neurofibrilar (Arendt *et al.*, 2016). También se ha sugerido que la formación de los NFTs podría ser un mecanismo neuroprotector, ya que al secuestrarse Tau hiperfosforilado se evitaría la ruptura de los microtúbulos por la acción de esta forma de Tau (Arendt *et al.*, 2016).

Pese a que la patología de la EA se explica principalmente a partir de la mayor producción y acumulación del péptido A β (hipótesis amiloide), se ha visto que para generar daño neuronal se requiere tanto de A β como de la proteína Tau (Tiwari *et al.*, 2019).

Adicionalmente, se ha identificado una clase de ensamblajes macromoleculares dinámicos, denominados gránulos de estrés (SG, del inglés *stress granules*), que están asociados con inclusiones patológicas en múltiples enfermedades neurodegenerativas, incluida la enfermedad de Alzheimer (Ash *et al.*, 2014; Vanderweyde *et al.*, 2012; Wolozin, 2012, 2019).

1.3 Gránulos de estrés

1.3.1 Composición y dinámica de los gránulos de estrés

Los gránulos de estrés son complejos citoplasmáticos sin membrana, compuestos por proteínas de unión a ARN (RBPs, del inglés *RNA-binding proteins*) y moléculas de ARNm que se ensamblan temporalmente en respuesta al estrés (Kedersha *et al.*, 2005).

El ensamblaje de gránulos de estrés es una estrategia celular conservada en los eucariotas para minimizar el daño relacionado con el estrés y promover la supervivencia celular. En respuesta a estas condiciones desfavorables, las células disminuyen la síntesis de la mayoría de las proteínas, detienen la traducción y el ARNm no traducido es almacenado temporalmente junto con otras proteínas, en focos citoplasmáticos, para promover la síntesis de proteínas citoprotectoras (Baradaran-Heravi *et al.*, 2020; Mahboubi y Stochaj, 2017).

Los SG pueden ser inducidos por una amplia variedad de estreses que incluyen estrés nutricional, por calor, por choque osmótico, por estrés oxidativo y por daño del ADN (Chen y Liu, 2017; Cruz *et al.*, 2019).

La composición de los SG varía con el tipo de estrés, su duración y el tipo de célula en la que ocurre (Buchan *et al.*, 2008). De forma general, los SG se componen clásicamente de ARNm detenidos en la traducción, de la subunidad ribosómica pequeña 40S, de la proteína PABP, de factores de inicio de la traducción (eIF3, eIF4F, eIF4G), de RBPs (como TIA-1 y G3BP1), además de otras proteínas que no se unen al ARN (Buchan y Parker, 2009; Kedersha *et al.*, 2013; Protter y Parker, 2016).

Estudios sugieren que los SG se componen de una subestructura central estable denominada “núcleo” que está rodeada por una capa más dinámica (Jain *et al.*, 2016; Protter y Parker, 2016).

Los SG se caracterizan por ser altamente dinámicos, ya que se encuentran en equilibrio dinámico con el citosol. Se ensamblan y desensamblan rápidamente (en minutos u horas) en respuesta a la aparición y a la eliminación del estrés, aunque la cinética es específica del tipo de estrés (Protter y Parker, 2016).

1.3.2 Formación de los gránulos de estrés

El ensamblaje de los SG es una consecuencia de un proceso de varios pasos que comienza con el reconocimiento del estrés y conduce a la detención de la traducción (Figura 3); lo

que da como resultado la formación de complejos de pre-iniciación (PIC) de la traducción. Los PIC contienen ARNm, el complejo ribosómico 40S y factores de inicio de la traducción asociados (Panas *et al.*, 2016; Wolozin e Ivanov, 2019).

En condiciones óptimas, el PIC se combina con la subunidad ribosomal 60S para producir ribosomas 80S, lo que permite la traducción de proteínas, sin embargo, bajo condiciones de estrés, el PIC se une a otras RBPs, lo que promueve la formación de los SG (Wolozin e Ivanov, 2019).

La detención de la traducción se logra mediante la inhibición del inicio de la traducción, el cual es un paso altamente regulado. Dos vías de señalización principales regulan el inicio de la traducción, así como la formación de los SG: la fosforilación de la subunidad alfa del factor 2 de iniciación de la traducción eucariota (eIF2 α) y el ensamblaje del complejo eIF4F de unión a cap (que consta de los factores de iniciación de la traducción eIF4E, eIF4G y eIF4A) (Panas *et al.*, 2016).

Tabla 2. Resumen de las vías de inhibición de la traducción que conducen a la formación de gránulos de estrés.

Estrés	Vía de inhibición	Mecanismo de inhibición de la traducción
eIF2α-P independiente		
Na ₂ SeO ₃ , ayuno de aminoácidos, rapamicina, H ₂ O ₂	Inhibición de mTOR	Interferencia con la traducción canónica dependiente de CAP
Pateamina A, silvestrol, hippuristanol 15d-PGJ2, tiRNAs	Interferencia con el complejo eIF4F	
eIF2α-P dependiente (activación de cinasas de eIF2α)		
Infección viral	PKR	Inhibición del intercambio GDP-GTP por eIF2B necesario para el reciclaje de los complejos ternarios que inician la traducción
Estrés de RE	PERK	
Ayuno	GCN2	
Estrés oxidativo (NaAsO ₂)	HRI	

Na₂SeO₃, selenito de sodio; H₂O₂, peróxido de hidrógeno; 15d-PGJ2, 15-desoxi-(12,14)-prostaglandina J2; RE, retículo endoplásmico; NaAsO₂; arsenito de sodio (Modificada de Riggs *et al.*, 2020).

La interrupción de la traducción puede ocurrir en diferentes etapas del inicio de la traducción y depende del tipo de estrés (Tabla 2), pero en la mayoría de los casos fisiológicos, la detención se desencadena por la fosforilación de eIF2 α . Por lo tanto, las tensiones que inducen SG se subdividen en aquellas que dependen de eIF2 α fosforilado (eIF2 α -P) y aquellas que no (es decir, tensiones dependientes de eIF2 α -P e independientes de eIF2 α -P) (Panas *et al.*, 2016; véase Tabla 2 y Figura 3).

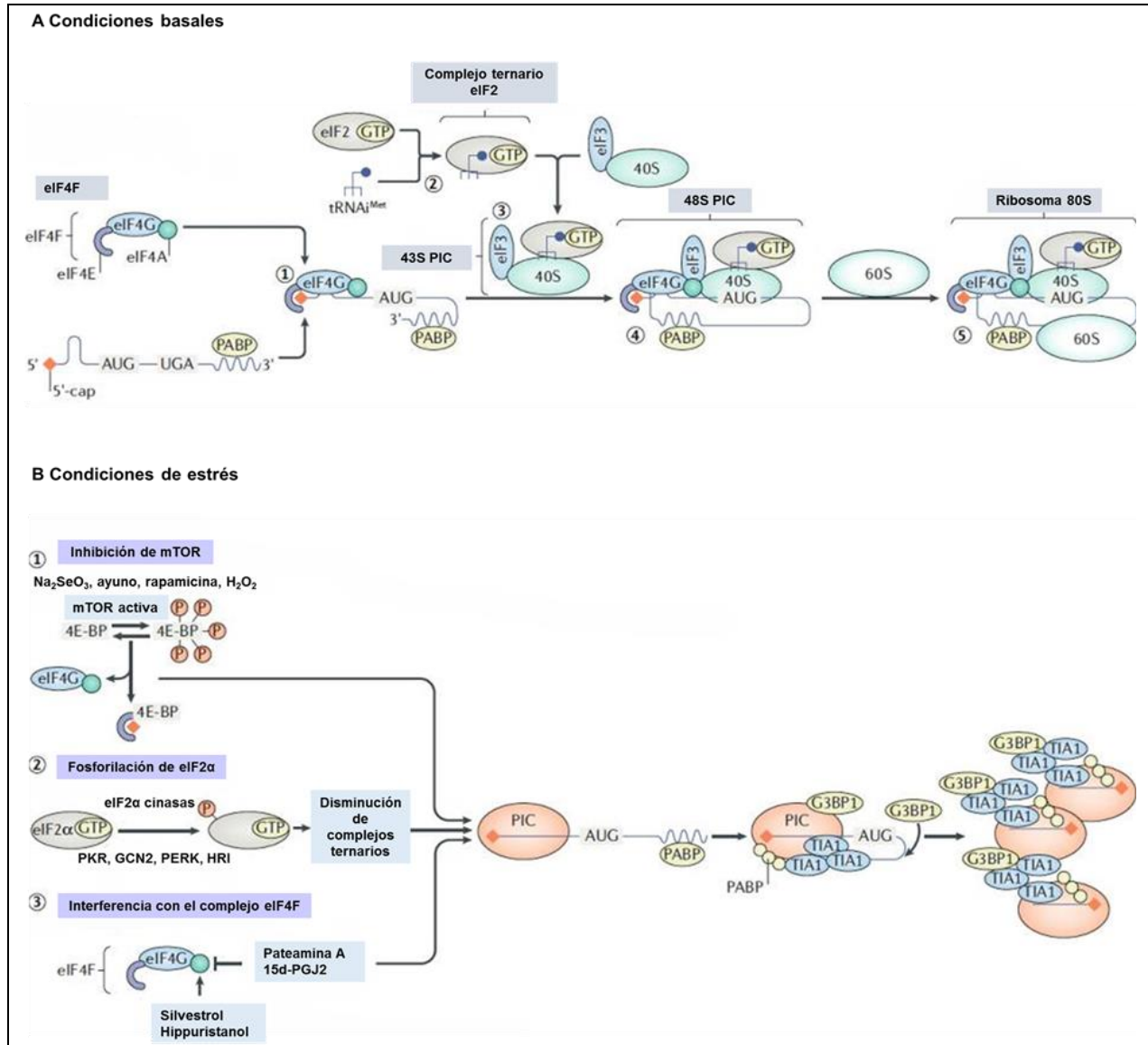


Figura 3. Regulación del ensamblaje de los gránulos de estrés. (A) El complejo de pre-iniciación (PIC) tiene un papel clave en la traducción del ARN y se forma a través de un proceso de varios pasos. El complejo del factor de iniciación de elongación 4F (eIF4F) reconoce la estructura del 5' cap en los ARNm (1). Mientras tanto, eIF2 se combina con un ARNt iniciador (tRNA^{iMet}) para formar un complejo ternario (2), que luego se combina con el ribosoma eIF3-40S para formar el PIC 43S (3). Este complejo se asocia con el complejo de ARNm eIF4F para formar el PIC 48S (4), que luego se une con el complejo 60S para iniciar la traducción del ARNm (5). (B) En condiciones de estrés cada una de las tres cascadas de señalización principales que regulan la formación de SG, provoca el desplazamiento de un elemento clave del PIC, lo que permite que las RBPs, como el antígeno intracelular 1 de células T (TIA1), se unan y formen los núcleos de los SG. La inhibición de la diana de la rapamicina en mamíferos (mTOR) reduce la fosforilación de la proteína de unión a eIF4E (4EBP), que se une a eIF4E y desplaza eIF4G-eIF4A de la estructura del cap de un ARNm (1). La fosforilación de eIF2 α impide que se forme el complejo ternario (2). Los fármacos (pateamina A y silvestrol) interfieren con el ensamblaje del complejo eIF4F en el cap del ARNm al dirigirse a la helicasa eIF4A, mientras que los ARN inducidos por estrés (tiRNA) derivados del ARNt desplazan los complejos eIF4F del ARNm (3). En cada caso, el PIC incompleto permite que las RBPs como TIA1 o la proteína 1 de unión a la proteína activadora de Ras GTPasa (G3BP1) se unan al ARNm y formen los núcleos de los SG. El SG madura con el tiempo, a medida que se unen RBPs adicionales. 15d-PGJ2, 15-desoxi-(12,14)-prostaglandina J2; PABP, proteína de unión a poli(A) (modificada de Wolozin e Ivanov, 2019).

Las diferentes condiciones de estrés detienen el inicio de la traducción pero permiten la elongación, lo que hace que los ribosomas que participan en la traducción se disocian del ARNm y los polisomas se desensamblen. El ARNm liberado puede unirse a RBPs y sirve como sustrato para la formación de los núcleos de los SG (Figura 4) (Kedersha *et al.*, 2005, Riggs *et al.*, 2020).

La nucleación de los SG en el citoplasma es mediada por un conjunto de RBPs, que incluyen, entre otras, al antígeno intracelular 1 de células T (TIA-1), la proteína 1 de unión a la proteína activadora de Ras GTPasa (G3BP1), la proteína relacionada con TIA1 (TIAR) y la tristetrapolina (TTP) (Kedersha *et al.*, 2005).

La mayoría de las RBPs nucleantes contienen dominios intrínsecamente desordenados (IDR), también conocidos como dominios de baja complejidad (LCD), que promueven el ensamblaje a través de un mecanismo de separación de fase líquido-líquido (LLPS) (Gilks *et al.*, 2004). El paso final del ensamblaje de los SG produce gránulos maduros. En esta etapa, las RBPs nucleantes reclutan proteínas adicionales y moléculas de señalización (Anderson y Kedersha, 2008).

Una vez que se elimina el estrés, los SG se desensamblan y se reanuda la traducción. El desensamblaje es mediado por chaperonas, por autofagia y por helicasas dependientes de ATP (Buchan *et al.*, 2013; Jain *et al.*, 2016; Kedersha *et al.*, 1999; Protter y Parker, 2016).

1.3.3 Gránulos de estrés en levadura

Los SG se describieron por primera vez en 1999, en células de mamífero, en donde han sido ampliamente estudiados (Kedersha *et al.* 1999). Sin embargo, durante la década siguiente, se identificaron y caracterizaron los SG en otras células eucariotas, incluyendo la levadura *S. cerevisiae* (Anderson y Kedersha, 2008).

En las células de *S. cerevisiae*, acumulaciones similares a SG se detectaron por primera vez en 2007, bajo condiciones de estrés por privación de glucosa y durante la fase estacionaria del crecimiento de la levadura (Hoyle *et al.*, 2007).

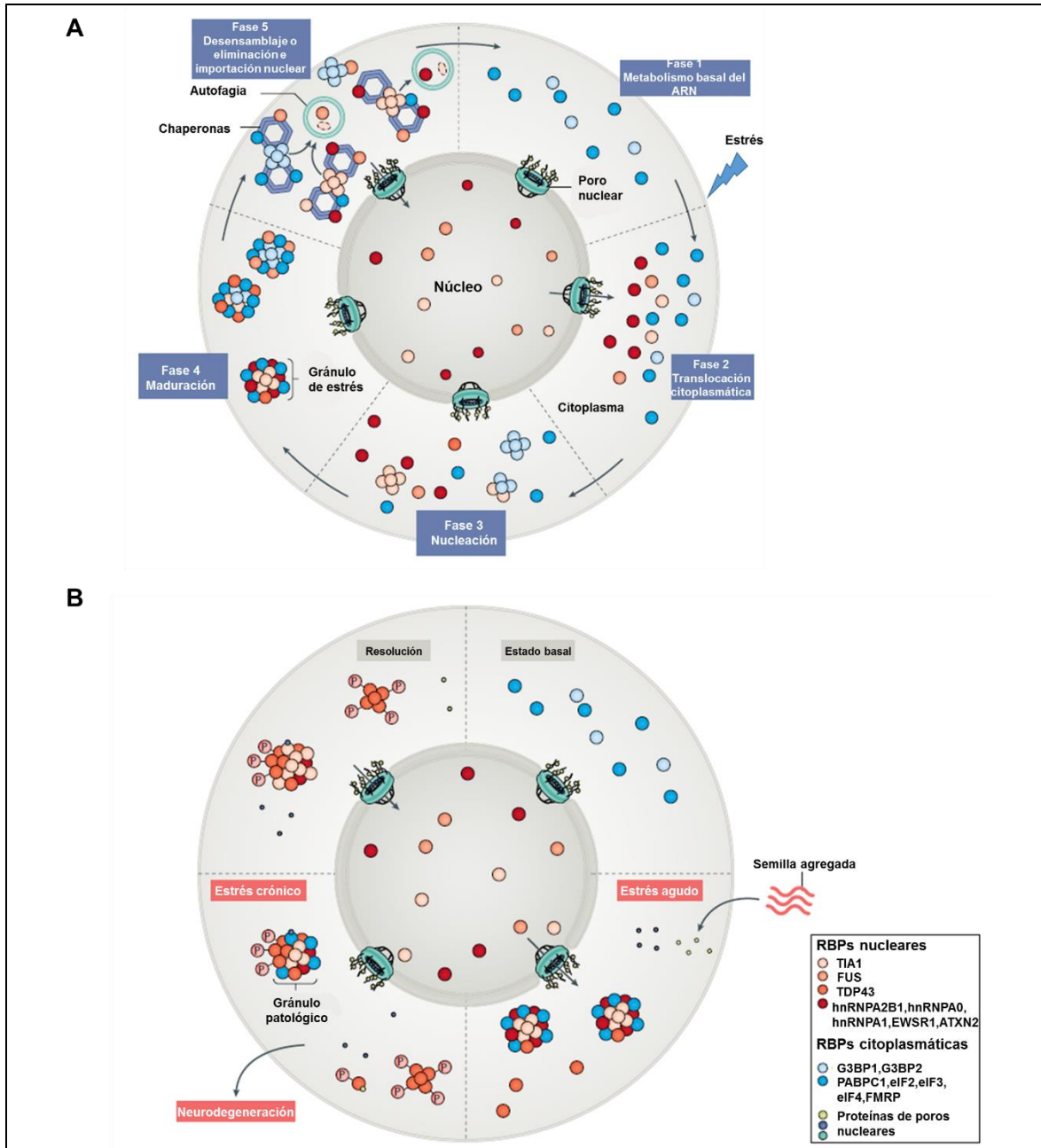


Figura 4. Fases del ciclo de los gránulos de estrés. (A) El ciclo de los SG fisiológicos comprende varias fases. En condiciones basales (Fase 1), la mayoría de las RBPs son nucleares, mientras que otras son citoplasmáticas. Con el estrés, las RBPs nucleares se translocan al citoplasma a través del poro nuclear (Fase 2). En la fase 3, los SG comienzan a nuclearse mediante la unión de las RBPs nucleadoras primarias como TIA-1 y G3BP1 al ARNm. Los SG maduran con el tiempo (Fase 4), consolidándose e incorporando múltiples RBPs secundarias, que incluyen proteínas como hnRNPA0, hnRNPA1, hnRNPA2B1, EWSR1 y ATXN2. Tras la eliminación del estrés, comienza la resolución de los SG (Fase 5), los SG se eliminan por autofagia o por chaperonas y las RBPs nucleares regresan al núcleo. (B) La formación de gránulos patológicos difiere con el ciclo descrito anteriormente. Con el estrés crónico, los SG se vuelven menos dinámicos y algunas proteínas asociadas a neurodegeneración (como TDP43 o Tau) pueden llegar a formar geles no fluidos y evolucionar hasta formar agregados insolubles patológicos (modificada de Wolozin e Ivanov, 2019).

Los gránulos de ARN citoplasmáticos detectados, se denominaron cuerpos EGP, ya que contenían los factores: eIF4E, eIF4G y Pab1 (componentes de los gránulos de estrés de mamíferos) (Hoyle *et al.*, 2007).

Posteriormente, en 2008, Buchan y colaboradores encontraron marcadores adicionales de SG de mamíferos dentro de los cuerpos de EGP y los denominaron "gránulos de estrés en levadura". Los autores demostraron que los SG que surgieron por la privación de glucosa en *S. cerevisiae* estaban relacionados en composición con los SG de mamíferos, ya que contenían ARNm traduccionalmente reprimidos, factores de inicio de la traducción (eIF4GI, eIF4GII y eIF4E), proteína de unión a cola de poli(A) (Pab1/PABP), RBPs ortólogas (Ngr1/TIAR, Pub1/TIA-1, Pbp1/Ataxina-2), así como otras proteínas (Hrp1, Gbp2, Nrp1 y Eap1) (Buchan *et al.*, 2008).

Adicionalmente, las proteínas ortólogas de TIA-1 y Ataxina-2, Pub1 y Pbp1, respectivamente, tienen un efecto similar en la formación de SG en células de levadura que sus dos contrapartes de mamíferos (Buchan *et al.*, 2008; Kedersha *et al.*, 1999).

A pesar de las similitudes entre los SG de levadura y células de mamífero, existen diferencias en la composición, el mecanismo de ensamblaje (Buchan y Parker, 2011) y la morfología de los SG entre mamíferos y levaduras (Jain *et al.*, 2016) (Tablas 3 y 4).

Tabla 3. Características de los gránulos de estrés en *S. cerevisiae* inducidos por diferentes condiciones de estrés.

Estrés	Condiciones	eIF2 α -P dependiente	Composición
Privación de glucosa	Sin glucosa	No	eIF4E*, eIF4G y Pab1 (EGP), Ngr1, Pub1, Pbp1
Calor	46°C ,10 min	No	EGP, eIF3, Ngr1, Pub1
Frío	0°C – 10°C 2–4 h	No	Pab1, Pub1
Fase estacionaria	YPD 4/6–7 días	N/A	EGP, Pub1, Pbp1
Etanol	10% - 15% (v/v) 20 min	No	eIF3,40S,Ngr1, Pub1
Azida de sodio	0.5% (v/v) 30 min	No	EGP. eIF3, Pub1, Pbp1

* EGP es un acrónimo utilizado para describir eIF4E, eIF4G y Pab1; N/A: no analizado (modificada de Grousl *et al.*, 2021)

Los SG de células de levadura privadas de glucosa difieren de alguna manera de los SG de eucariotas superiores evolutivos. A diferencia de los SG de mamíferos, que se forman

principalmente por los PIC de la traducción estancados, los SG de levadura desencadenados por la privación de glucosa no contienen los componentes centrales, es decir, el factor de iniciación de la traducción 3 (eIF3) y la subunidad ribosómica pequeña (40S) (Buchan *et al.*, 2008; Panas *et al.*, 2016).

Finalmente, la formación de los SG es potenciada por un alelo constitutivamente activo de la cinasa Gcn2/GCN2, que inhibe el inicio de la traducción mediante la fosforilación de eIF2 α , asemejándose al modelo común de ensamblaje de los SG de mamíferos (Anderson y Kedersha, 2008; Buchan *et al.*, 2008; Kedersha *et al.*, 1999). Sin embargo, se ha demostrado que la actividad de la quinasa Gcn2 y la fosforilación correspondiente de eIF2 α no son necesarias para la inhibición de la traducción tras el agotamiento de la glucosa en células de levadura (Grousl *et al.*, 2021).

Además de la privación de glucosa, existen otros tipos de estrés que desencadenan la formación de SG en las células de levadura (Tabla 3). En 2009, se observó que el estrés por calor (46°C) inducía la formación de SG. Los SG inducidos por calor contienen, además de los componentes de los SG inducidas por privación de glucosa, el factor de iniciación de la traducción eIF3 (es decir, Rpg1/eIF3a, Prt1/eIF3b y Nip1/eIF3c) y una proteína de subunidad ribosómica pequeña, representada por Rps30A (Grousl *et al.*, 2021) (Tabla 3). Sin embargo, no se ha confirmado la presencia de componentes de la subunidad ribosómica pequeña en los SG inducidas por el estrés por calor de la levadura (Wallace *et al.*, 2015).

En general, la formación de SG de levadura inducida por calor requiere moléculas de ARNm libres de ribosomas, así como aquellos SG que se ensamblan en eucariotas superiores. Sin embargo, a diferencia de lo que se ha observado en mamíferos, la formación de SG es independiente de la fosforilación del factor eIF2 α (Grousl *et al.*, 2009, 2013) (ver Tabla 3).

Adicionalmente, las SG que son inducidas por calor se ensamblan independientemente de la proteína Pub1/TIA-1. Esto contrasta directamente con la formación de SG en levaduras privadas de glucosa y células de mamíferos que requieren de esta proteína para su ensamblaje (Buchan *et al.*, 2008, 2011; Gilks *et al.*, 2004; Grousl *et al.*, 2009; Kedersha *et al.*, 1999).

Al igual que el estrés por calor, el estrés por frío también se ha identificado como un desencadenante del ensamblaje de los SG, tanto en células de levadura como de mamífero. En células que crecieron en cultivo a 10°C o menos durante varias horas, las RBPs Pub1/TIA-1, Pab1/PABP y el ARNm poli(A) (Tabla 3) se unen formando focos citoplasmáticos y su ensamblaje es independiente de la fosforilación del factor eIF2 α (Hofmann *et al.*, 2012).

Las células de levadura cambian continuamente su modo de metabolismo a medida que se produce el agotamiento gradual de los nutrientes durante el crecimiento celular, el cese del crecimiento y la entrada en la fase estacionaria. El agotamiento de nutrientes durante la fase estacionaria representa un tipo de estrés y se han observado SG en células de levadura que han entrado en la fase estacionaria de crecimiento, los cuales contienen las proteínas Pbp1/Ataxina-2, Pab1/PABP, Pbp4 y Pub1/TIA-1 (Shah *et al.*, 2016). Sin embargo aún no se ha determinado si su ensamblaje es dependiente o no de eIF2 α (Grousl *et al.*, 2021).

Otros tipos de estrés son capaces de desencadenar la formación de SG en células de levadura, entre los que cuales se encuentran el estrés oxidativo debido a la presencia de azida de sodio y el estrés por etanol (Grousl *et al.*, 2021; Kato *et al.*, 2011), los cuales muestran diferencias de ensamblaje y composición con los SG de mamíferos (Tabla 3).

Tabla 4. Diferencias entre los gránulos de estrés de mamíferos y de levadura.

Característica	Mamíferos	Levadura (<i>S. cerevisiae</i>)
Estructura	Estructura central estable con múltiples núcleos de RNPs (~ 4.7 núcleos), rodeada por una capa más dinámica (caparazón).	Un núcleo central de RNPs, con una capa de fase separada más pequeña.
Ensamblaje	<ul style="list-style-type: none"> • Modificaciones postraduccionales • Dos vías de ensamblaje de SG • Dependiente e independiente de la fosforilación de eIF2α 	<ul style="list-style-type: none"> • Condiciones ambientales • Independientes de la fosforilación de eIF2α
RBPs	Ataxina-2 (Atx-2) G3BP1 TIA-1 USP10 TIAR	Pbp1 Bre5 Pub1 Ubp3 Ngr1

Buchan *et al.*, 2008; Jain *et al.*, 2016; Kedersha *et al.*, 1999; Kroschwald *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2014.

La vía de señalización principal en la inhibición del inicio de la traducción en respuesta a diferentes tipos de estrés y el ensamblaje de los SG en células de mamífero, es mediante la fosforilación de eIF2 α . (Hofmann *et al.*, 2021). Sin embargo, los SG de levadura inducidos por todas las condiciones de estrés mencionadas, se ensamblan independientemente de la fosforilación de eIF2 α (Tabla 3). No obstante, el mecanismo de detención de la traducción durante estas tensiones sigue siendo desconocido (Grousl *et al.*, 2021).

Los SG en células de mamífero están compuestos por varios núcleos estables rodeados por una capa más dinámica. Mientras que en los SG de levadura, la capa externa de los SG posee propiedades dinámicas similares a las de los SG de mamíferos, en tanto, la parte interna está formada por un solo “núcleo” y es más rígida (Jain *et al.*, 2016) (Tabla 4).

1.3.4 TIA-1/Pub1 en los gránulos de estrés

La proteína TIA-1 y su homólogo de levadura Pub1 son RBPs implicadas en la regulación de la traducción (Anderson y Kedersha, 2008). TIA-1 se localiza principalmente en el núcleo, donde regula múltiples aspectos del metabolismo del ARN, incluido el empalme alternativo, la represión de la traducción y el silenciamiento del ARNm. Sin embargo, tras el estrés celular, se redistribuye al citoplasma donde promueve la nucleación de los SG (Gilks *et al.*, 2004; Kedersha *et al.*, 1999).

Estructuralmente TIA-1 tiene un dominio similar a prión (PrLD) en el sitio C-terminal y tres motivos de reconocimiento a ARN (RRM) en el sitio N-terminal (Kedersha *et al.*, 1999). El PrLD de TIA-1 se puede sustituir por el dominio de agregación del prión de levadura (Sup35) y mantener su función de ensamblaje de SG (Gilks *et al.*, 2004).

TIA-1 se ha asociado recientemente a enfermedades neurodegenerativas como ALS y FTD debido a la presencia de mutaciones en su dominio PrLD. (Baradaran-Heravi *et al.*, 2018; Dobra *et al.*, 2018). Otro caso de asociación con estas enfermedades es la EA; en ésta se ha visto que una reducción de los niveles de TIA-1, en modelos murinos, genera protección contra la neurodegeneración cerebral mediada por Tau (Apicco *et al.*, 2018).

Por otro lado, uno de los primeros componentes de los SG descritos en la levadura *S. cerevisiae* fue la proteína de unión a poli (U) (Pub1). Inicialmente se encontró que Pub1 participaba en la regulación del procesamiento del ARNm y posteriormente se encontró que participa en el ensamblaje de gránulos de estrés (Anderson *et al.*, 1993; Buchan *et al.*, 2008).

Al igual que su homólogo en mamíferos TIA-1, Pub1 tiene tres motivos de reconocimiento de ARN (RRM) y una región de baja complejidad (LCD) o (PrLD), que exhibe agregación y propagación de tipo priónico (Gotor *et al.*, 2020; Su y Harrison, 2020).

De forma similar a TIA-1, Pub1 forma condensados en respuesta al estrés celular (Buchan *et al.*, 2008). Recientemente se demostró que la disminución de los niveles de ATP celular y una acidificación subsecuente del citosol, desencadenan el ensamblaje de Pub1 en SG, y que los condensados inducidos por diferentes condiciones de estrés (ayuno de glucosa o calor extremo) presentan diferentes características biofísicas (condensados tipo gel o sólidos, respectivamente) (Kroschwald *et al.*, 2018). También se observó que Pub1 tiene una capacidad intrínseca a separarse en fase líquida (LLPS) en respuesta al estrés fisiológico, lo que sugiere que Pub1 puede funcionar como un biosensor para detectar cambios específicos en el medio celular (Kroschwald *et al.*, 2018).

1.3.5 Gránulos de estrés y neurodegeneración

Un sello distintivo de las enfermedades neurodegenerativas es la acumulación de agregados de proteínas citoplasmáticas en las neuronas de los sujetos afectados. Se ha sugerido la posible participación de los SG en la patogenia de enfermedades neurodegenerativas como la EA, la FTD y la esclerosis lateral amiotrófica (ALS) (Baradaran-Heravi *et al.*, 2020; Dobra *et al.*, 2018; Wolozin e Ivanov, 2019).

La conexión entre los SG y estas enfermedades proviene de observaciones histológicas que vinculan las proteínas marcadoras de SG, incluidas TIA1, TIAR, G3BP1 y ATXN2 con los agregados patológicos de proteínas intracelulares y extracelulares característicos de

estas enfermedades neurodegenerativas (Baradaran-Heravi *et al.*, 2020; Dobra *et al.*, 2018; Vanderweyde *et al.*, 2012, 2016).

En respuesta al estrés, las células neuronales forman SG transitorios cuya dinámica se encuentra fuertemente controlada, pero cuando el estrés es crónico, como en las enfermedades neurodegenerativas, los SG se pueden hacer persistentes y comúnmente aberrantes (Wolozin e Ivanov, 2019). Los SG persistentes pueden interferir con la función neuronal silenciando la transcripción y secuestrando proteínas necesarias para el correcto funcionamiento celular (Chen y Liu, 2017, Kedersha *et al.*, 2013; Ramaswami *et al.*, 2013).

Finalmente, las altas concentraciones de las proteínas asociadas a neurodegeneración, en los SG, aumenta la probabilidad de que estas proteínas formen estructuras estables de tipo amiloide que pueden ser tóxicas para la célula (Dobra *et al.*, 2018; Protter y Parker, 2016; Wolozin e Ivanov, 2019).

1.3.6 Tau y los gránulos de estrés

Tau normalmente es más abundante en los axones de las neuronas, donde su función es regular la dinámica de los microtúbulos, sin embargo, en la EA, Tau se fosforila y se relocaliza en el soma y en la dendrita, donde puede interactuar con las RBPs asociadas a SG (Apicco *et al.*, 2018; Maziuk *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2018; Vanderweyde *et al.*, 2012, 2016).

Estudios de patología molecular en pacientes con EA y cultivos neuronales de ratón han mostrado colocalización de Tau (hiperfosforilada o mal plegada) con TIA-1, y se ha observado que la interacción de Tau con TIA-1 promueve, por un lado, la formación de SG, y por otro el plegamiento incorrecto y la agregación de Tau en los SG (Vanderweyde *et al.*, 2012, 2016).

Asimismo, se ha observado que la reducción de los niveles de TIA-1 previene la formación de los SG que contienen a Tau, previniendo así la neurodegeneración mediada por Tau (Apicco *et al.*, 2018).

Por otro lado, se sabe que un gran número de RBPs tienen la capacidad de formar organelos intracelulares sin membrana de manera reversible a través de la LLPS. En la mayoría de los casos, la transición de fase de estas proteínas está impulsada por el LCD (Molliex *et al.*, 2015). La proteína Tau, a pesar de no tener un LCD definido, pero debido a su carácter intrínsecamente desordenado y a su distribución de carga no homogénea, muestra una tendencia a someterse a LLPS cuando se encuentra en presencia del ARN, de manera similar a las RBPs (Wegmann *et al.*, 2018).

Estas observaciones sugieren un modelo en el que Tau se asocia tanto a las RBPs como con el ARN en los SG, promoviendo así la agregación de Tau en los SG.

Justificación

La proteína Tau es el componente principal de los ovillos neurofibrilares intracelulares, los cuales junto con las placas seniles extracelulares de péptido β amiloide ($A\beta$) son características patológicas principales de la EA.

Los SG son complejos citoplasmáticos sin membrana, compuestos por RBPs, factores de inicio de la traducción y ARNm, que se ensamblan bajo condiciones de estrés. La formación de los SG es una estrategia celular conservada en los eucariotas, para reducir el daño relacionado con el estrés y promover la supervivencia celular, deteniendo la traducción del ARNm y almacenándolo temporalmente, junto con otras proteínas, en los SG, para así, favorecer la síntesis de proteínas citoprotectoras (Baradaran-Heravi *et al.*, 2020; Kedersha *et al.*, 2005).

En respuesta al estrés, las células neuronales forman SG transitorios cuya dinámica se encuentra fuertemente controlada, pero cuando el estrés es crónico, como en las enfermedades neurodegenerativas, los SG pueden volverse persistentes y comúnmente aberrantes (Wolozin e Ivanov, 2019).

La persistencia de los SG pueden interferir con la función neuronal silenciando la transcripción y secuestrando proteínas necesarias para el correcto funcionamiento celular (Chen y Liu, 2017, Kedersha *et al.*, 2013; Ramaswami *et al.*, 2013). Así como también, se sugiere que pueden actuar como un nido para la agregación de proteínas relacionadas con las enfermedades neurodegenerativas (Dobra *et al.*, 2018; Wolozin e Ivanov, 2019).

Estudios de patología molecular en pacientes con EA, así como en cultivos neuronales de ratón, mostraron colocalización de la proteína Tau (hiperfosforilada o mal plegada) con la proteína TIA-1, encargada de formar los núcleos de los SG. Se observó que la interacción de Tau con TIA-1 promueve, por un lado, la formación de SG, y por otro el plegamiento incorrecto y la agregación de Tau en los SG (Apicco *et al.*, 2018; Maziuk *et al.*, 2018;

Vanderweyde *et al.*, 2012, 2016). Sin embargo, el mecanismo por el cual se promueve la formación de agregados de Tau insolubles en los SG, aún no ha sido determinado.

La levadura no tiene un ortólogo de Tau, no obstante, la levadura expresa una proteína ortóloga a TIA-1, que es Pub1, esto sugiere que los procesos de formación de los SG pueden estar conservados (Anderson *et al.*, 1993; Buchan *et al.*, 2008). Adicionalmente, la proteína Tau humana se ha expresado en células de *S. cerevisiae* y estos estudios de Tau en modelo de levadura han ayudado a comprender mejor la relación entre la hiperfosforilación de Tau, la agregación y la unión a microtúbulos (Chernoff *et al.*, 2020).

La asociación de Tau a los SG en modelo de levadura, no ha sido estudiada hasta el momento. Sin embargo, el empleo de un modelo de levadura nos puede proporcionar un enfoque novedoso para estudiar los mecanismos moleculares que regulan la formación de agregados de Tau insolubles en los SG.

El uso de la levadura, para este tipo de estudios, tiene varias ventajas con respecto a los modelos de células de mamífero, tales como la facilidad de su manejo, el rápido crecimiento de la levadura, la gran cantidad de herramientas genéticas disponibles, así como la facilidad de generar, aislar y caracterizar mutantes (De Vos *et al.*, 2011; Chernoff *et al.*, 2020).

Basado en lo anterior, en este proyecto se pretende determinar si la isoforma larga de Tau (2N4R), expresada heterológamente en *S. cerevisiae*, se asocia a SG cuando las células se someten a diferentes condiciones de estrés.

Hipótesis

Al someter a condiciones de estrés a las células de *Saccharomyces cerevisiae* que expresan la isoforma 2N4R de la proteína Tau humana, se promoverá la formación de gránulos de estrés y la agregación de Tau en estos.

Objetivos

4.1 Objetivo general

Determinar si la isoforma 2N4R de la proteína Tau, expresada heterológamente en *S. cerevisiae*, se agrega y se asocia a gránulos de estrés cuando las células se someten a diferentes condiciones de estrés.

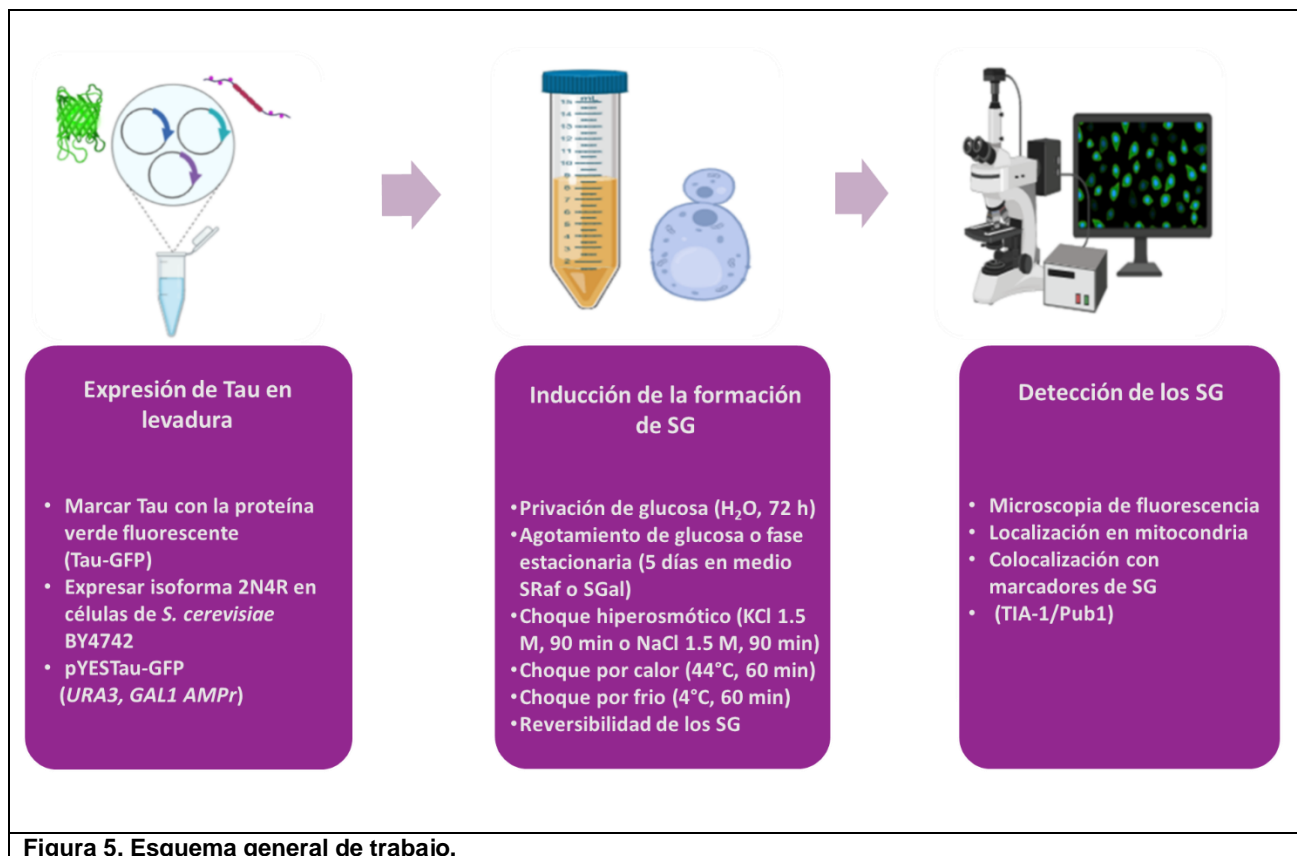
4.2 Objetivos particulares

- ❖ Evaluar la expresión de la proteína Tau fusionada a una proteína fluorescente en células de *S. cerevisiae*
- ❖ Determinar bajo qué condiciones de estrés las células de levadura que expresan la proteína Tau forman gránulos de estrés
- ❖ Determinar si existe colocalización de la proteína Tau con proteínas marcadoras de gránulos de estrés en células de *S. cerevisiae*

Materiales y métodos

5.1 Esquema general de trabajo

En la figura 5 se muestra el esquema general de trabajo utilizado.



5.2 Cepas y plásmidos

Para fines de este proyecto se emplearon células de levadura de la especie *S. cerevisiae* de la cepa BY4742. Las características de las cepas y plásmidos utilizados en este trabajo se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Cepas y plásmidos utilizados.

Cepa	Nombre	Genotipo	Referencia
	BY4742	<i>MATα</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>lys2Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i>	Derivada de la cepa S288C
Plásmidos	Nombre	Características	
	pYES-TauGFP	<i>URA3</i> , GAL1 AMP ^r	Yaisa Castillo
	pYX223-mtOFP	<i>HIS3</i> , GAL1, AMP ^r	Diana García

5.3 Condiciones de cultivo

Las levaduras se cultivaron a 30°C en medio completo YPD (1 % extracto de levadura, 2 % peptona y 2 % glucosa).

Para la selección de cepas transformadas se usó medio mínimo sintético SD (0.69 % base nitrogenada, 2 % glucosa y 20 μ g/mL de cada aminoácido necesario para el crecimiento y selección de los plásmidos). De acuerdo a los requerimientos de cada experimento, en algunos casos la glucosa se intercambi3 por galactosa o rafinosa.

5.4 Transformación de levaduras

Para fines de detección de Tau, se empleó la construcción de Tau fusionada con la proteína verde fluorescente (GFP). Se transformaron células de *S. cerevisiae* BY4742 con el plásmido pYES+Tau-GFP.

Para la detección de las mitocondrias se co-transformó con el plásmido pYX223-mtOFP, que contiene una pre-secuencia mitocondrial fusionada a la proteína naranja fluorescente.

Las células de levadura se cultivaron en medio YPD líquido hasta su fase de crecimiento exponencial ($DO_{600}=0.5$), posteriormente se centrifugaron y se lavaron con agua y amortiguador (0.1 M de TE pH 7.5 y 0.1 M de acetato de litio LiOAc pH 7.5).

Las células se resuspendieron en el mismo amortiguador y se tomó una alícuota que se mezcló con 10 ng de plásmido y 50 μ g de ADN de esperma de salmón. A esta mezcla se le agregó amortiguador (40 % de polietilenglicol (PEG), 0.1 M TE pH 7.5, 0.1 M LiOAc pH 7.5) y se incubó durante 30 minutos a 30°C. Posteriormente, se agregó DMSO y se incubó a 42°C por 15 minutos. Finalmente, las células transformantes se plaquearon en medio selectivo, de acuerdo con el plásmido utilizado en cada transformación.

5.5 Expresión de Tau en levadura

La expresión de Tau a partir de vector pYES se realizó de dos formas:

1. Las transformantes fueron incubadas a 30°C de 14-16 horas en 5 mL de SRaf-Ura. Se ajustó la densidad óptica ($DO_{600}=0.5$) con este mismo medio de cultivo complementado con galactosa al 2 % y se dejó incubando a 30°C durante 3 horas. Posteriormente se permitió que las células crecieran hasta la fase estacionaria durante la noche.
2. Las transformantes fueron incubadas hasta la fase estacionaria en 5 mL de medio SGal-Ura.

Las transformantes con el plásmido pYX223-mtOFP se incubaron a 30°C en 5 mL del medio SGal-Ura-His hasta la fase estacionaria.

5.6 Inducción de la formación de gránulos de estrés

Se evaluaron los tratamientos establecidos para inducir la formación de SG en *S. cerevisiae* y se definieron las condiciones de estrés bajo las cuales se indujo la formación de SG.

5.6.1 Privación de glucosa o ayuno

Para evaluar el estrés por privación de glucosa se utilizaron 2 métodos diferentes, dependiendo del medio que se utilizó para expresar a Tau.

Para la expresión y crecimiento a partir del medio que contenía galactosa (SGal), se utilizó el método de ayuno con H₂O. Se removió el medio en el que se encontraban las células, centrifugando a 8000 rpm durante un minuto y resuspendiendo en agua estéril en dos ocasiones para eliminar todo el medio residual. Las células se resuspendieron en agua estéril y se dejaron incubando a 30°C en agitación hasta las 72 h, tomando muestras cada 24 h, para ver el curso temporal de la formación de SG. Las células se fijaron y observaron en el microscopio de epifluorescencia.

Para el crecimiento y expresión a partir del medio que contenía rafinosa (SRaf) complementado con galactosa al 2 %, se utilizó el método de agotamiento de glucosa o también llamado fase estacionaria. Se incubaron las células en el medio a 30°C en agitación constante, hasta que llegaron a la fase estacionaria y se dejaron incubando por 5 días, hasta el agotamiento de la fuente de carbono. Las células se fijaron durante 15 minutos a temperatura ambiente, agregando formaldehído a una concentración final de 3.7 % y se observaron con un objetivo 100X en el microscopio de epifluorescencia. Cada experimento tuvo 3 réplicas por condición.

5.6.2 Choque térmico

Las células fueron expuestas tanto a choque por calor (44°C), como a choque por frío (4°C) por 60 min. Después de la incubación con agitación, las células se fijaron y observaron en el microscopio de epifluorescencia. Se realizaron 3 réplicas por condición.

5.6.3 Estrés hiperosmótico

Las células fueron sometidas a estrés hiperosmótico al incubarlas en una solución 1.5 M de NaCl o KCl por 90 min a 30°C, en agitación constante. Después de la incubación las células

se fijaron y observaron en el microscopio de epifluorescencia utilizando un objetivo 100X. Cada experimento tuvo 3 réplicas por condición.

5.7 Observación de la formación de gránulos de estrés

La observación de la formación de gránulos de estrés se realizó mediante microscopía de epifluorescencia. Para el análisis microscópico se utilizó un sistema de microscopio de epifluorescencia Olympus BX61 y Nikon eclipse E100. La observación de las células en el microscopio Olympus BX61 se realizó inmediatamente y sin fijación, mientras que las células observadas en el microscopio Nikon eclipse E100 fueron fijadas anteriormente. Para ello, las células se expusieron por 15 minutos a temperatura ambiente a una concentración final de 3.7 % de paraformaldehído y se observaron al día siguiente. Sin embargo, los tiempos de exposición fueron los mismos y se observaron con un objetivo 100X en ambos casos. Las imágenes fueron procesadas utilizando el software Fiji ImageJ.

5.8 Ensayo de reversibilidad y desensamblaje de los gránulos de estrés

Para poder evaluar la reversibilidad del ensamblaje de los gránulos de estrés, las células sometidas a privación de glucosa se colocaron, después de la condición de estrés, en un medio de recuperación completo que contenía glucosa (YPD) o galactosa (YPGal) por 30 y 60 min. Pasado el tiempo de recuperación se observaron en el microscopio de epifluorescencia con un objetivo 100x.

Resultados

6.1 Expresión de Tau en levadura y formación de gránulos de estrés por privación de glucosa.

La expresión de Tau en las levaduras se consiguió mediante la activación de un promotor inducible por galactosa, ya que el gen que codifica para Tau se clonó bajo el control del promotor GAL1.

Cuando las células se crecen en galactosa se detecta, mediante microscopia de fluorescencia, la forma de Tau etiquetada con GFP (Figura 6). Se aprecia expresión significativa de Tau y una distribución heterogénea en la célula. A las 24 h de ayuno en agua, los agregados de Tau adquieren forma circular o puntiforme que aparentan estar en la zona de la membrana plasmática (flechas color rojo). Estos agregados aumentan de tamaño y disminuyen en número a las 48 h. A las 72 h de ayuno, los agregados se hacen más grandes y son más notorios.

6.2 Colocalización de Tau en la mitocondria

Recientemente ha surgido evidencia que demuestra localización de Tau en las mitocondrias o su asociación con la membrana mitocondrial externa (Cieri *et al.*, 2018). Para detectar si la aparente formación de gránulos ocurre en el citoplasma, así como para detectar si parte de Tau se localiza en la mitocondria, se co-transformó a las células con el plásmido pYX223-mtOFP que expresa una pre-secuencia mitocondrial etiquetada con OFP. Las células transformantes se pusieron en condiciones de ayuno en H₂O por 24 y 48 h.

En la figura 7 se observa que Tau se agrega en regiones extra-mitocondriales (flechas amarillas) después del ayuno tanto a 24 como a las 48 h.

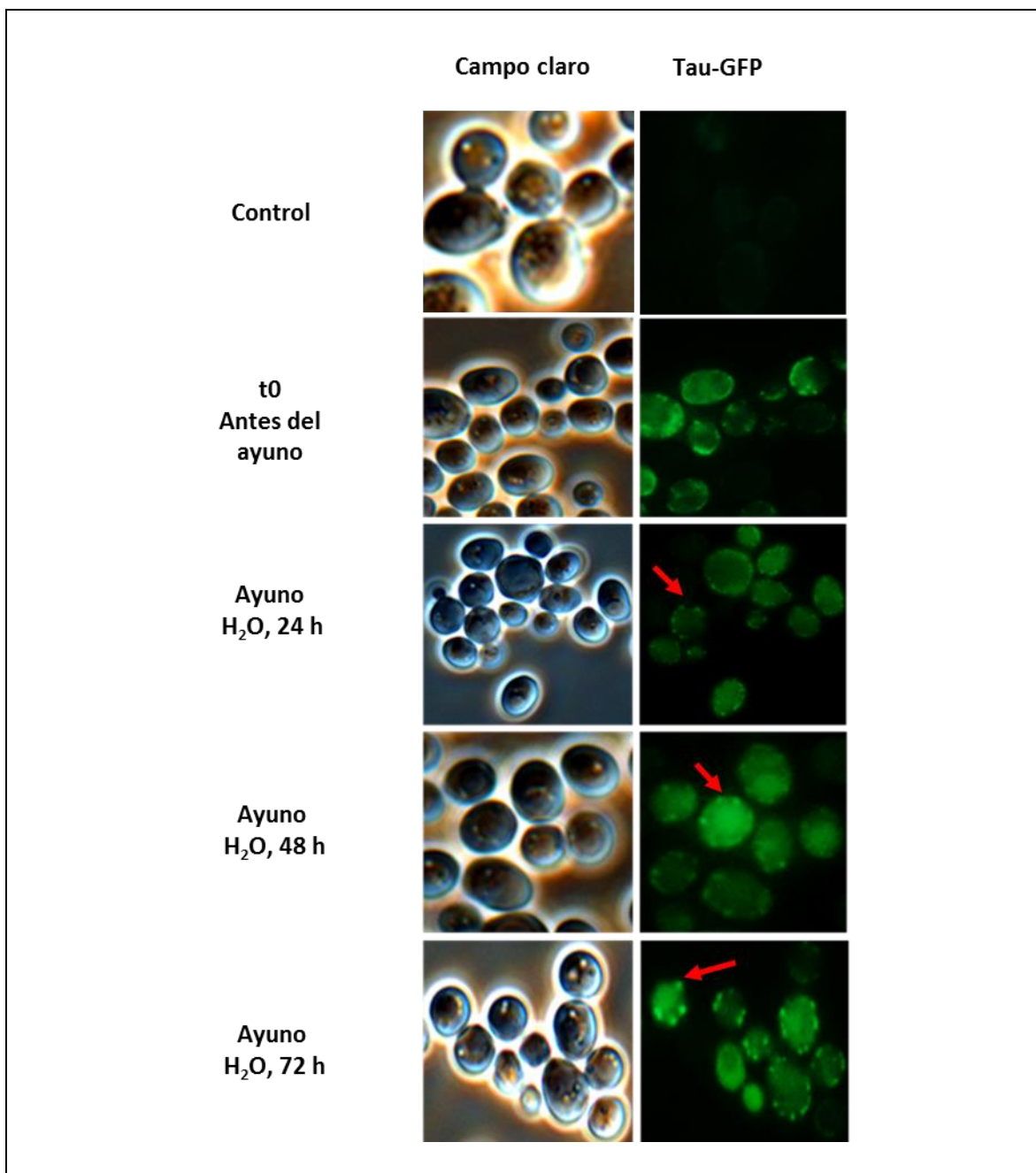


Figura 6. Inducción de gránulos de estrés por privación de glucosa en células de *S. cerevisiae* que expresan la isoforma de Tau 2N4R marcada con la proteína verde fluorescente (GFP). Las células se cultivaron hasta la fase logarítmica a 30°C en medio SGal (galactosa al 2 %) para la inducción de la expresión de Tau. Las células se pusieron en condición de estrés por privación de glucosa (o fuente de carbono) en H₂O estéril por 72 h a 30°C, en agitación constante. El control corresponde a las células de *S.cerevisiae* BY4742 sin la proteína Tau. t0, corresponde a las células de *S.cerevisiae* transformadas con el plásmido pYESTau-GFP e incubadas hasta la fase exponencial en el medio SGal y antes de someterse al estrés. Las flechas de color rojo representan la formación de los agregados de Tau en gránulos parecidos a SG conforme avanza el tiempo de ayuno.

Sin embargo, a las 48 horas de ayuno los agregados de Tau se hacen más visibles y solamente en algunos casos hay colocalización con la mitocondria (flechas rosas). Los condensados que se observan en esta condición son parecidos a los observados en la figura 6 durante la privación de glucosa.

Por tanto, se puede concluir que hay localización de Tau en las mitocondrias, en estas condiciones de estrés. Sin embargo, la mayoría de los agregados de Tau durante el ayuno en agua por 72 h son extra mitocondriales.

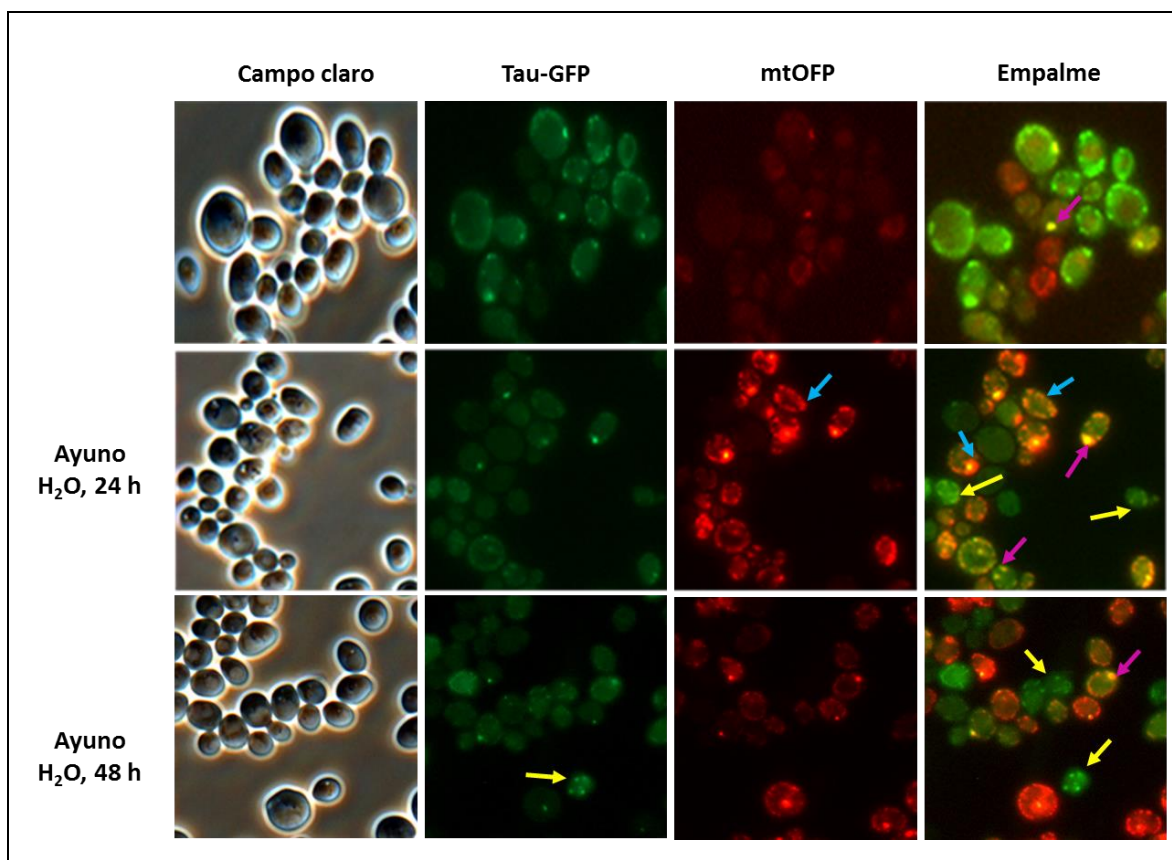


Figura 7. Co-localización de Tau en la mitocondria en condiciones de estrés por ayuno en agua. Las células se cultivaron hasta la fase logarítmica a 30°C en medio SGal (galactosa al 2 %) para la inducción de la expresión de Tau-GFP a partir del vector pYES y la pre-secuencia mitocondrial mt-OFP a partir del vector pYX223. Las flechas amarillas corresponden a la localización de los agregados de Tau extra mitocondriales. Las flechas azules corresponden a la OFP mitocondrial, mientras que las flechas de color rosa corresponden a la colocalización de Tau en las mitocondrias.

6.3 Efecto de otros tipos de estrés en la acumulación de Tau en posibles SG

Se expuso a las células a diversas condiciones de estrés, incluido el estrés hiperosmótico (NaCl 1.5 M y KCl 1.5 M), el agotamiento de la fuente de carbono hasta que las células llegaron a la fase estacionaria de crecimiento, estrés por calor (44°C), y estrés por frío (4°C), como se describe en el apartado de materiales y métodos. Se examinó si en la exposición a estas condiciones las células presentaban acumulación de Tau en SG (figura 8). Encontramos que la exposición a diferentes condiciones de estrés induce la formación de agregados de Tau (ver figura 8 y tabla 6).

En el choque térmico, durante la exposición a 4°C muy pocas células formaron acumulados de Tau visibles, mientras que en el choque por calor a 44°C, los agregados fueron más numerosos y se observaron en la mayoría de las células. Sin embargo, éstos presentaron una forma menos definida y aparentemente su tamaño fue menor al de los formados en otros tipos de estrés.

Con el estrés hiperosmótico se observaron agregados con una apariencia punteada. Aunque no se observó diferencia entre los gránulos formados en el estrés generado por KCl y el generado por NaCl (figura 8).

Finalmente, en el estrés generado por el agotamiento de la fuente de carbono por 5 días, se observó la presencia de un gran número de agregados de gran tamaño y una morfología punteada.

Tabla 6. Efecto de las diferentes condiciones de estrés en la formación de los gránulos de estrés.

Estrés	Formación de SG	Reversibilidad	Observaciones
Ayuno en agua	Si	Si	Presencia de agregados de forma circular o puntiforme, que aumentan de tamaño y disminuyen en número conforme avanza el tiempo de ayuno.
Agotamiento de la fuente de carbono	Si	Si	Presencia de un gran número de agregados de gran tamaño y una morfología punteada.
Choque por frío	Si	ND	Muy pocas células formaron agregados puntiformes
Choque por calor	Si	ND	Formación de agregados puntiformes. Presentaron una forma menos definida y un tamaño menor al de los formados en otras condiciones de estrés.
Choque hiperosmótico por KCl	Si	ND	Presencia de agregados con una apariencia puntiforme
Choque hiperosmótico por NaCl	Si	ND	Formación de agregados con apariencia punteada, similares a los generado por KCl

ND: no determinado.

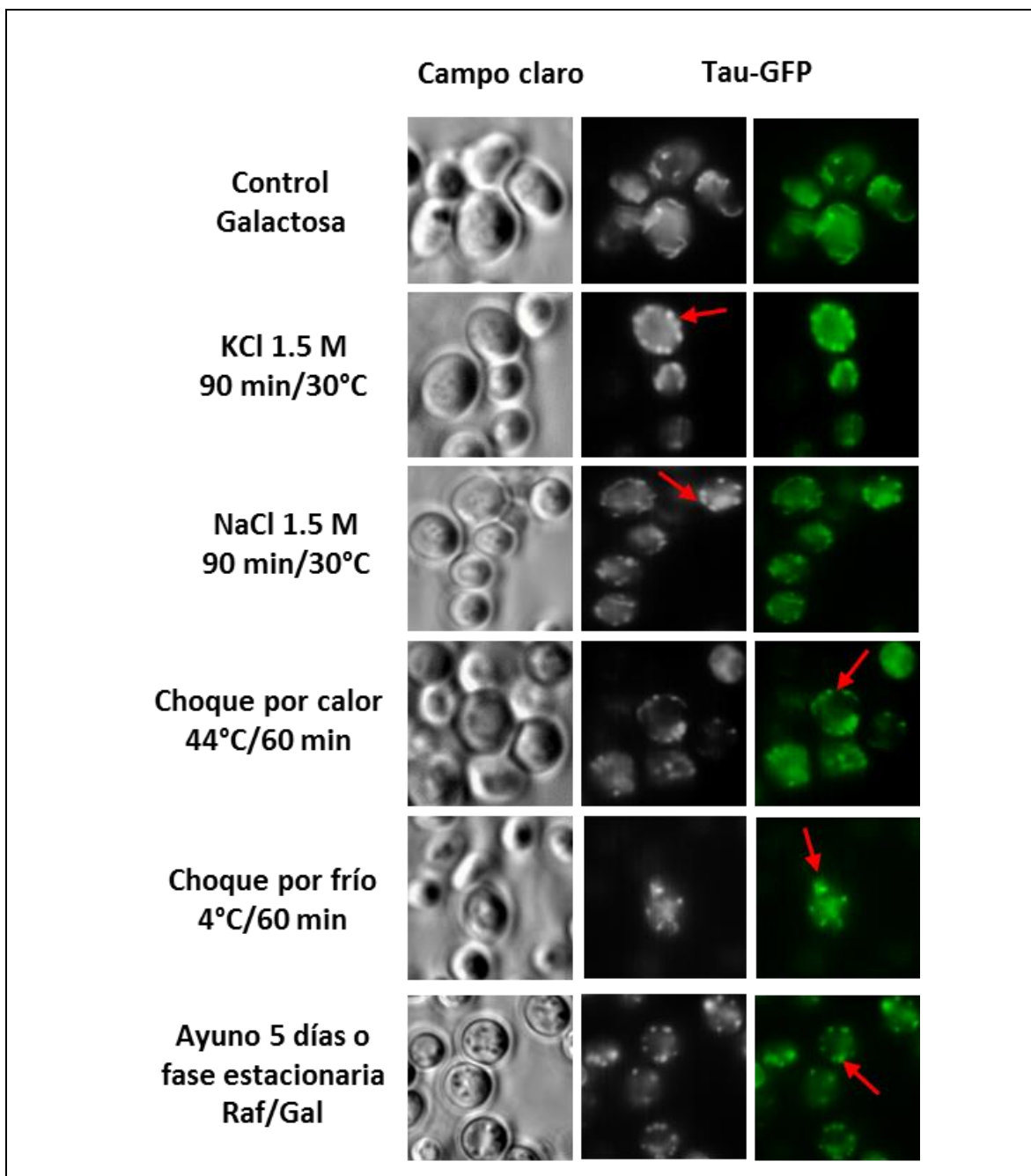


Figura 8. Efecto de diferentes condiciones de estrés en la acumulación de Tau en posibles gránulos de estrés. Las células se expusieron a diversas condiciones de estrés para promover la formación de SG y la acumulación de Tau en ellos. Las condiciones utilizadas fueron ausencia de estrés (control, en medio SGal), estrés hiperosmótico (NaCl 1.5 M y KCl 1.5 M por 90 min), estrés por calor (44°C) y estrés por frío (4°C) durante 60 min, así como también ayuno por agotamiento de fuente de carbono o hasta que las células llegaron a la fase estacionaria en medio SRaf/Gal por 5 días. Las flechas rojas corresponden a los agregados de Tau en SG después de la exposición a las diversas condiciones de estrés.

6.4 Reversibilidad y desensamblaje de los gránulos de estrés

Para poder evaluar la reversibilidad del ensamblaje de los gránulos, característica típica de los SG, las células sometidas a privación de glucosa tanto por ayuno en H₂O como por agotamiento de la fuente de carbono por 5 días, se incubaron después del estrés, en un medio completo de recuperación que contenía glucosa o galactosa (YPD o YPGal) por 30 y 60 min, tal como se explica en el apartado materiales y métodos.

Cuando las células ayunadas, tanto por ayuno en agua como por agotamiento de la fuente de carbono, fueron incubadas en un medio con glucosa (YPD) por 30 y 60 minutos (figura 9 y 10) se pudo observar que los agregados disminuyeron en tamaño y en número, y aumentó la fluorescencia no concentrada en puntos específicos. Esto sugiere que hay un proceso de disolución de los agregados y, por tanto, un posible efecto de reversión del ensamblaje de los SG.

Mientras que, cuando la recuperación de las células ayunadas se hizo en un medio con galactosa (YPGal), no se observó un cambio significativo en la presencia de los agregados de Tau, es decir, éstos persistieron agregados (flechas azules) y solo en algunas células se apreció fluorescencia dispersa en la célula.

En resumen, se presentó reversibilidad de la formación de agregados al eliminar el estrés por ayuno por glucosa, al incubar a las células en un medio completo con glucosa (YPD).

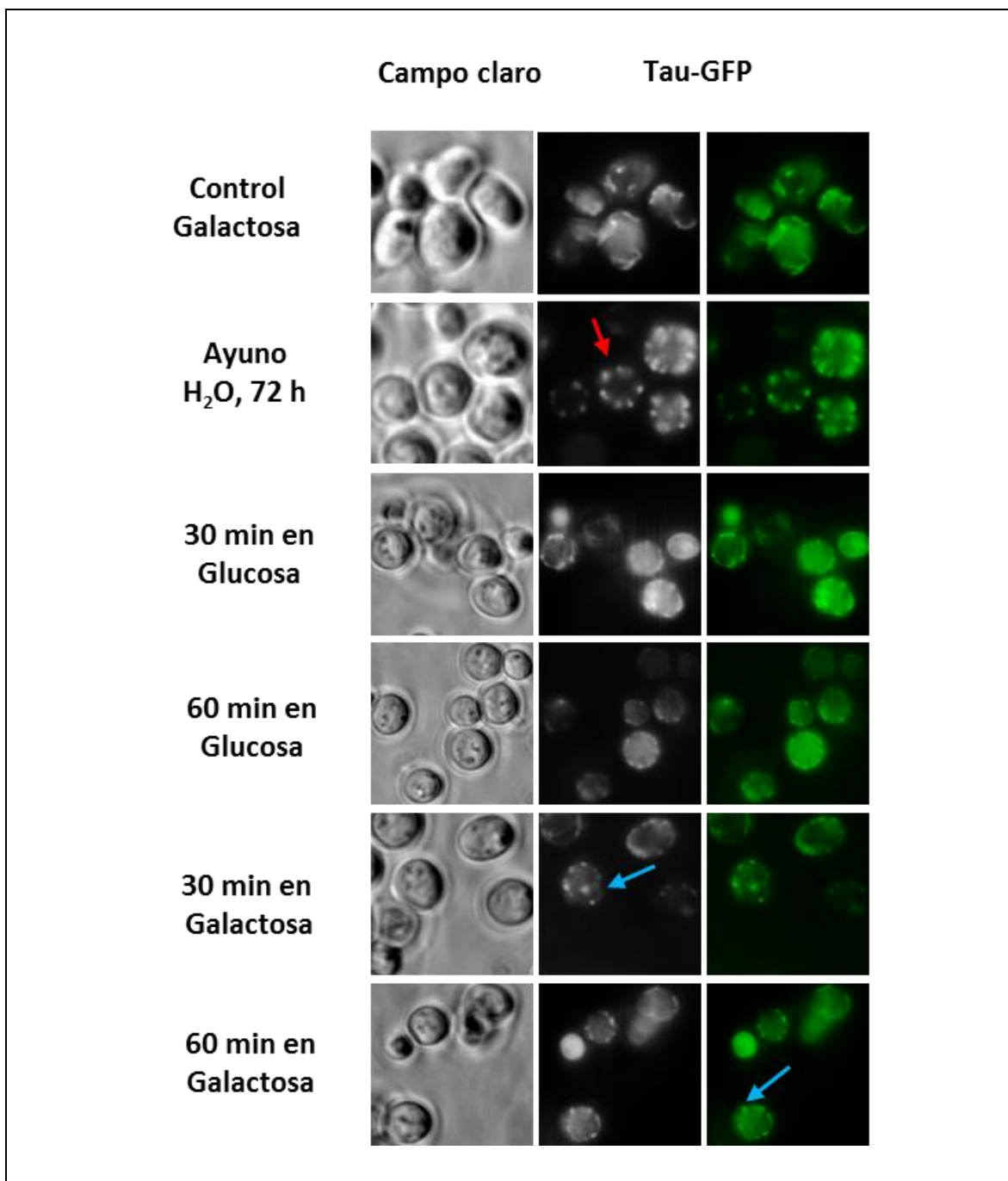


Figura 9. Ensayo de reversibilidad y desensamblaje de los gránulos de Tau en las células sometidas a estrés por privación de glucosa. Las células se sometieron a estrés por privación de glucosa en H₂O por 72 horas a 30°C. Las flechas rojas corresponden a los agregados de Tau formados después de la exposición al estrés. Las flechas azules muestran la persistencia de gránulos de menor tamaño después de poner a las células en el medio de recuperación YPGal tanto a los 30 como a los 60 min. En las células recuperadas del estrés en el medio YPD se observa una disolución de los gránulos de Tau a los 30 y a los 60 minutos.

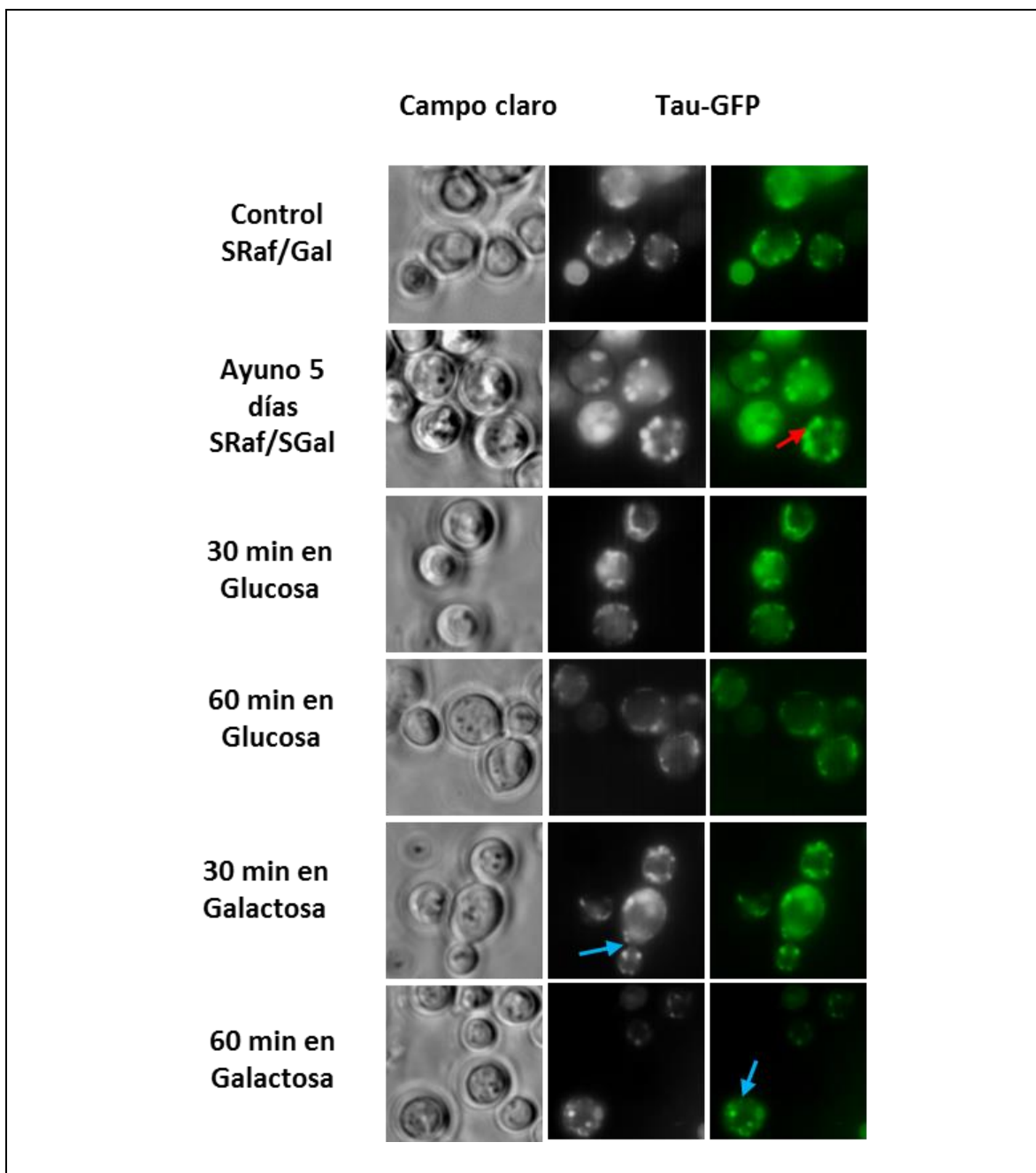


Figura 10. Ensayo de reversibilidad y desensamblaje de los gránulos de Tau en las células sometidas a estrés por agotamiento de fuente de carbono. Las células se cultivaron en el medio SRaf/Gal y se incubaron por 5 días a 30°C, hasta el agotamiento de la fuente de carbono en el medio. Las flechas rojas corresponden a los agregados de Tau formados después de la exposición al estrés. Las flechas azules muestran la persistencia de algunos gránulos de menor tamaño después de incubación a las células en el medio de recuperación con galactosa (YPGal) tanto a los 30 como a los 60 min. Mientras que se observa una disolución de los gránulos de Tau en las células recuperadas del estrés en el medio con glucosa (YPD) a los 30 y los 60 minutos.

Discusión

Nuestros resultados indican que las células de *S. cerevisiae* con la isoforma larga de Tau humana (2N4R) expresada heterológamente y sometidas a diferentes condiciones de estrés, tales como la privación de glucosa, el estrés hiperosmótico, el estrés por calor y por frío, estimularon la acumulación de Tau en agregados citoplasmáticos.

A pesar de que uno de los objetivos de este trabajo consistía en determinar si los agregados citoplasmáticos de Tau coinciden con los marcadores de SG, esto no pudo llevarse a cabo, debido a las restricciones experimentales ocasionadas por la pandemia de COVID-19. No obstante, la colocalización con dichos marcadores de SG no es la única forma para su identificación.

En nuestro caso, las características morfológicas de los agregados, su distribución en forma de focos citoplasmáticos puntiformes, su dinámica de formación durante condiciones de estrés extremas, su ensamblaje en agregados que aumentan de tamaño con el tiempo cuando se exponen a estrés prolongado, así como su reversibilidad y desensamblaje al eliminar el estrés, como en el caso del estrés por privación de glucosa, sugieren que las inclusiones citoplasmáticas de Tau observadas en *S. cerevisiae* corresponden a SG.

Desde luego, la comprobación definitiva de la inclusión de Tau en SG en levadura se obtendrá al hacer experimentos de co-localización con proteínas marcadoras de SG como Pub1 o TIA-1 (la cual se expresaría heterológamente) en *S. cerevisiae*.

Además, ya que en mamíferos se han encontrado evidencia de que Tau se asocia a SG y que esta asociación es promovida por TIA-1 (Vanderweyde *et al.*, 2012; Maziuk *et al.*, 2018). La expresión y colocalización de TIA-1 en levadura o su homólogo Pub1 con los SG de Tau, nos puede ayudar a dilucidar cuál es la participación de TIA-1 en la agregación de Tau en las lesiones patológicas observadas en tejido humano con EA.

A pesar de que todas las condiciones de estrés utilizadas promovieron la acumulación de Tau en agregados citoplasmáticos en *S. cerevisiae*, se pudo observar diferencias en la

formación de los agregados en las diferentes condiciones experimentales (tabla 6). Esto es debido a que tanto la cinética de ensamblaje como la composición de los SG de levadura depende del tipo del estrés (Buchan *et al.*, 2008; Hoyle *et al.*, 2007).

Durante la exposición al estrés por calor, se observó la formación de agregados puntiformes de Tau, sin embargo, durante el estrés por frío, se pudo observar que muy pocas células formaban estos agregados de Tau. Por otro lado, no se observaron diferencias en la morfología de los agregados formados por el estrés hiperosmótico con KCl y NaCl, probablemente a que la naturaleza química de ambos compuestos es muy parecida y por lo tanto desencadenan la misma vía de ensamblaje de los SG.

En el estrés por privación de glucosa, tanto por ayuno en agua como por agotamiento de la fuente de carbono, los agregados que se formaron eran puntiformes, aumentaban de tamaño, así como disminuían en número de agregados conforme avanzaba el tiempo del estrés. En cambio, en el estrés hiperosmótico como en el estrés por choque térmico, el tiempo de exposición al estrés fue muy corto (de 60 a 90 min), por lo cual el efecto de maduración de los SG hacia agregados más grandes y estables no pudo ser observado.

Aun cuando, en los otros tipos de estrés que estudiamos (hiperosmótico y térmico) se formaron también agregados aparentemente citoplasmáticos correspondientes a SG, las condiciones experimentales utilizadas en el laboratorio contrastan notablemente con las condiciones de estrés crónico presentes en las enfermedades neurodegenerativas, ya que en estos ensayos el estrés es agudo y en condiciones no fisiológicas, mientras que las enfermedades neurodegenerativas son crónicas y evolucionan a lo largo de los años (Wolozin e Ivanov, 2019).

Asimismo, se ha visto que con el estrés crónico en las enfermedades neurodegenerativas, los SG se pueden hacer persistentes y comúnmente aberrantes (Dobra *et al.*, 2018; Wolozin e Ivanov, 2019). Aunado a que las altas concentraciones de las proteínas asociadas a neurodegeneración, en los SG, aumenta la probabilidad de que estas proteínas formen agregados patológicos de tipo amiloide (Dobra *et al.*, 2018; Protter y Parker, 2016; Wolozin e Ivanov, 2019).

Por lo anterior, el modelo de acumulación de Tau en SG por privación de glucosa, tanto por ayuno en agua como por agotamiento de la fuente de carbono, nos puede ayudar a observar

la persistencia de los SG durante el estrés crónico, así como la dinámica en el ensamblaje y maduración de los SG hasta su transición en agregados insolubles.

Por tal motivo, estas condiciones de estrés fueron las que se seleccionaron para realizar el ensayo de reversibilidad de los SG, observándose que al incubar a las células ayunadas en un medio con glucosa (YPD) por 30 y 60 minutos (figura 9 y 10), los agregados disminuyeron en tamaño y en número, así como también aumentó la fluorescencia no concentrada en puntos específicos. Esto sugiere que hay un proceso de disolución de los agregados y, por tanto, un posible efecto de reversión del ensamblaje de los SG.

Mientras que, cuando la recuperación de las células ayunadas se hizo en un medio con galactosa (YPGal), no se observó un cambio significativo en la presencia de los agregados de Tau, es decir, éstos persistieron agregados y solo en algunas células se apreció fluorescencia dispersa en la célula.

Adicionalmente, en nuestro sistema, la expresión de Tau depende de la presencia de galactosa en el medio, ya que su gen está regulado por el promotor GAL1. Esto implica que en condiciones normales, la inducción de la expresión cesa en ausencia de galactosa o en presencia de glucosa.

Nosotros observamos la presencia de Tau aún en periodos largos de tiempo sin el inductor, por ejemplo, en ayuno con H₂O. Esto indica que la proteína Tau que se observa en los posibles SG es estable y posiblemente sufre poco recambio, lo que constituye una evidencia adicional de que las estructuras observadas pueden ser SG.

Debido a lo anterior, es que se pudieron observar agregados de Tau en el control con galactosa a tiempo cero, antes de someter a las células a las condiciones de estrés, esto probablemente se deba a que la galactosa a pesar de ser el inductor de la expresión de la proteína Tau en las células, es un factor de estrés para las mismas, ya que no es la fuente de carbono de elección de *S. cerevisiae*. Sin embargo, esto se podría solucionar al utilizar un promotor constitutivo o uno inducible diferente a GAL1.

Por otro lado, tanto el envejecimiento, como los trastornos neurodegenerativos, incluida la EA, se caracterizan por un hipometabolismo de la glucosa progresivo en el cerebro, un

aumento en la disfunción mitocondrial y daños oxidativos que pueden alterar la actividad neuronal (Grimm, 2021).

De igual forma, se ha demostrado que la proteína Tau hiperfosforilada tiene un impacto directo en la función mitocondrial, así como también está asociada con alteraciones en el metabolismo de la glucosa en el cerebro (Cieri *et al.*, 2018; Grimm, 2021; Lauretti *et al.*, 2017; Szabo *et al.*, 2020).

Tau anormalmente hiperfosforilada tiene un impacto en todos los aspectos de las funciones mitocondriales, desde el transporte y la dinámica mitocondrial, hasta la bioenergética y la mitofagia. También se ha observado una mayor asociación de Tau hiperfosforilada con las membranas del RE en muestras de cerebros post mortem de pacientes con EA (Szabo *et al.*, 2020). Recientemente ha surgido evidencia que demuestra localización de Tau en las mitocondrias, en la membrana mitocondrial externa y en el espacio intermembrana mitocondrial, sin embargo, el papel de Tau a nivel mitocondrial aún no está claro (Cieri *et al.*, 2018).

Por lo tanto, para detectar si parte de Tau agregada se localiza en la mitocondria, así como para verificar que la aparente formación de SG asociados a Tau ocurre en el citoplasma, se co-transformó a las células con el plásmido pYX223-mtOFP que expresa una pre-secuencia mitocondrial etiquetada con OFP. Las células transformantes se pusieron en condiciones de privación de glucosa por ayuno en agua por 24 y 48 h (Figura 7). Se encontró que existe localización de Tau en la mitocondria, sin embargo la mayoría de los agregados de Tau se encuentran en regiones extra-mitocondriales después del ayuno tanto a 24 como a las 48 h. El estrés nutricional pudo haber favorecido la localización de Tau en la mitocondria, sin embargo, esto necesita ser corroborado.

Ya que se ha demostrado que la disminución de la glucosa en el cerebro, aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), activando las cinasas dirigidas a Tau, como la proteína cinasa activada por mitógeno P38 (P38 MAPK), glucógeno sintasa cinasa-3 (GSK3) y la cinasa aminoterminal de C-Jun (JNK), lo que desencadena hiperfosforilación y agregación anormal de Tau (Lauretti y Praticò; 2015; Lauretti *et al.*, 2017). Así como también se ha demostrado que la proteína Tau hiperfosforilada induce daño sináptico y

muerte neuronal, pero también altera la función mitocondrial, lo que puede exacerbar la patología de Tau (Grimm, 2021).

Por lo tanto, la privación de glucosa en levadura puede ser un buen modelo para reproducir los defectos en la utilización de glucosa que ocurren de manera temprana en el cerebro de pacientes con deterioro cognitivo leve y en etapas iniciales de la EA.

Así como también, la acumulación de Tau en SG de levadura que se observa por agotamiento de la fuente de carbono o por ayuno en agua, parecen ser buenos acercamientos metodológicos para estudiar los requerimientos del ensamblaje y desensamblaje de los SG en células que expresen Tau, así como la maduración de los mismos hacia agregados patológicos y los efectos que esto puede tener en la fisiología celular, los cuales podrían ser extrapolados a los sistemas de mamíferos.

Finalmente, la combinación del estrés crónico por privación de glucosa y la expresión de Tau en células de *S. cerevisiae* puede representar un modelo adicional para el estudio de SG de Tau y su implicación en la EA.

Conclusiones

- ❖ Diferentes condiciones de estrés en las células que expresan de forma heteróloga la isoforma larga de Tau humana (2N4R), incluida la privación de glucosa, el estrés hiperosmótico, el estrés por calor y por frío, estimularon la acumulación de Tau en agregados tipo SG en *S. cerevisiae*.
- ❖ El estrés hiperosmótico con KCl, así como con NaCl, promovió la agregación de Tau en gránulos citoplasmáticos en células de *S.cerevisiae*.
- ❖ El estrés por choque con calor, favoreció la agregación de Tau en gránulos citoplasmáticos en células de *S.cerevisiae*.
- ❖ El estrés por choque con frío provocó la formación de agregados citoplasmáticos de Tau en muy pocas células de *S.cerevisiae*.
- ❖ El estrés por privación de glucosa, tanto por ayuno en agua como por el agotamiento de la fuente de carbono, promovieron la agregación de Tau en gránulos citoplasmáticos reversibles en células de *S.cerevisiae*.
- ❖ Tau se localizó en las mitocondrias durante la exposición al estrés por privación de glucosa en ayuno en agua, en células de *S.cerevisiae*.

Perspectivas

- ❖ Verificar que los agregados citoplasmáticos de Tau obtenidos en condiciones de estrés correspondan a gránulos de estrés, mediante la colocalización de Tau con marcadores de SG.
- ❖ Determinar si la isoforma 2N4R presente en los SG se encuentra fosforilada, así como el grado de fosforilación, para poder evaluar que especie de Tau se encuentra asociada a los SG.
- ❖ Caracterizar los SG asociados a Tau en *S. cerevisiae*, mediante el aislamiento y purificación de los núcleos de los SG asociados a Tau
- ❖ Expresar heterológamente TIA-1 en células de *S. cerevisiae* y ver si se asocia a Tau en SG de levadura, para poder determinar si la interacción de TIA-1 con Tau puede promover la agregación de Tau.
- ❖ Expresar otras isoformas de Tau en *S. cerevisiae* y evaluar si se asocian en SG y bajo qué condiciones celulares se ensamblan, con el fin de poder determinar si el número de repetidos de las isoformas (3R y 4R) favorece o no su agregación en los SG.

Referencias

1. Anderson, J. T., Paddy, M. R., & Swanson, M. S. (1993). PUB1 is a major nuclear and cytoplasmic polyadenylated RNA-binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, *13*(10), 6102–6113. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.10.6102-6113.1993>
2. Anderson, P., & Kedersha, N. (2008). Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends in biochemical sciences*, *33*(3), 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.12.003>
3. Apicco, D. J., Ash, P., Maziuk, B., LeBlang, C., Medalla, M., Al Abdullatif, A., Ferragud, A., Botelho, E., Ballance, H. I., Dhawan, U., Boudeau, S., Cruz, A. L., Kashy, D., Wong, A., Goldberg, L. R., Yazdani, N., Zhang, C., Ung, C. Y., Tripodis, Y., Kanaan, N. M., ... Wolozin, B. (2018). Reducing the RNA binding protein TIA1 protects against tau-mediated neurodegeneration in vivo. *Nature neuroscience*, *21*(1), 72–80. <https://doi.org/10.1038/s41593-017-0022-z>
4. Arendt, T., Stieler, J. T., & Holzer, M. (2016). Tau and tauopathies. *Brain research bulletin*, *126*(Pt 3), 238–292. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.08.018>
5. Ash, P. E., Vanderweyde, T. E., Youmans, K. L., Apicco, D. J., & Wolozin, B. (2014). Pathological stress granules in Alzheimer's disease. *Brain research*, *1584*, 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.05.052>
6. Baradaran-Heravi, Y., Van Broeckhoven, C., & van der Zee, J. (2020). Stress granule mediated protein aggregation and underlying gene defects in the FTD-ALS spectrum. *Neurobiology of disease*, *134*, 104639. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104639>
7. Buchan, J. R., & Parker, R. (2009). Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Molecular cell*, *36*(6), 932–941. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.11.020>
8. Buchan, J. R., Kolaitis, R. M., Taylor, J. P., & Parker, R. (2013). Eukaryotic stress granules are cleared by autophagy and Cdc48/VCP function. *Cell*, *153*(7), 1461–1474. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.037>
9. Buchan, J. R., Muhlrad, D., & Parker, R. (2008). P bodies promote stress granule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology*, *183*(3), 441–455. <https://doi.org/10.1083/jcb.200807043>
10. Buchan, J. R., Yoon, J. H., & Parker, R. (2011). Stress-specific composition, assembly and kinetics of stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of cell science*, *124*(Pt 2), 228–239. <https://doi.org/10.1242/jcs.078444>
11. Chen, L., & Liu, B. (2017). Relationships between Stress Granules, Oxidative Stress, and Neurodegenerative Diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2017*, 1809592. <https://doi.org/10.1155/2017/1809592>
12. Chernoff, Y. O., Grizel, A. V., Rubel, A. A., Zelinsky, A. A., Chandramowlishwaran, P., & Chernova, T. A. (2020). Application of yeast to studying amyloid and prion diseases. *Advances in genetics*, *105*, 293–380. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2020.01.002>
13. Cieri, D., Vicario, M., Vallese, F., D'Orsi, B., Berto, P., Grinzato, A., Catoni, C., De Stefani, D., Rizzuto, R., Brini, M., & Cali, T. (2018). Tau localises within mitochondrial sub-compartments and its caspase cleavage affects ER-mitochondria interactions and cellular Ca²⁺ handling. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, *1864*(10), 3247–3256. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.07.011>
14. Couchie, D., Mavilia, C., Georgieff, I. S., Liem, R. K., Shelanski, M. L., & Nunez, J. (1992). Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(10), 4378–4381. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.10.4378>
15. Cruz, A., Verma, M., & Wolozin, B. (2019). The Pathophysiology of Tau and Stress Granules in Disease. *Advances in experimental medicine and biology*, *1184*, 359–372. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9358-8_26

16. De Vos, A., Anandhakumar, J., Van den Brande, J., Verduyck, M., Franssens, V., Winderickx, J., & Swinnen, E. (2011). Yeast as a model system to study tau biology. *International journal of Alzheimer's disease*, 2011, 428970. <https://doi.org/10.4061/2011/428970>
17. Dehmelt, L., & Halpain, S. (2005). The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome biology*, 6(1), 204. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-6-1-204>
18. Dobra, I., Pankivskiy, S., Samsonova, A., Pastre, D., & Hamon, L. (2018). Relation Between Stress Granules and Cytoplasmic Protein Aggregates Linked to Neurodegenerative Diseases. *Current neurology and neuroscience reports*, 18(12), 107. <https://doi.org/10.1007/s11910-018-0914-7>
19. Falcon, B., Zhang, W., Schweighauser, M., Murzin, A. G., Vidal, R., Garringer, H. J., Ghetti, B., Scheres, S., & Goedert, M. (2018). Tau filaments from multiple cases of sporadic and inherited Alzheimer's disease adopt a common fold. *Acta neuropathologica*, 136(5), 699–708. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1914-z>
20. Gilks, N., Kedersha, N., Ayodele, M., Shen, L., Stoecklin, G., Dember, L. M., & Anderson, P. (2004). Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Molecular biology of the cell*, 15(12), 5383–5398. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-08-0715>
21. Goedert, M., & Jakes, R. (1990). Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *The EMBO journal*, 9(13), 4225–4230.
22. Goedert, M., & Spillantini, M. G. (2019). Ordered Assembly of Tau Protein and Neurodegeneration. *Advances in experimental medicine and biology*, 1184, 3–21. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9358-8_1
23. Goedert, M., Baur, C. P., Ahringer, J., Jakes, R., Hasegawa, M., Spillantini, M. G., Smith, M. J., & Hill, F. (1996). PTL-1, a microtubule-associated protein with tau-like repeats from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of cell science*, 109 (Pt 11), 2661–2672. <https://doi.org/10.1242/jcs.109.11.2661>
24. Goedert, M., Spillantini, M. G., Jakes, R., Rutherford, D., & Crowther, R. A. (1989). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron*, 3(4), 519–526. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90210-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90210-9)
25. Gotor, N. L., Armaos, A., Calloni, G., Torrent Burgas, M., Vabulas, R. M., De Groot, N. S., & Tartaglia, G. G. (2020). RNA-binding and prion domains: the Yin and Yang of phase separation. *Nucleic acids research*, 48(17), 9491–9504. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa681>
26. Grimm A. (2021). Impairments in Brain Bioenergetics in Aging and Tau Pathology: A Chicken and Egg Situation?. *Cells*, 10(10), 2531. <https://doi.org/10.3390/cells10102531>
27. Grousl, T., Ivanov, P., Frýdlová, I., Vasicová, P., Janda, F., Vojtová, J., Malínská, K., Malcová, I., Nováková, L., Janosková, D., Valásek, L., & Hasek, J. (2009). Robust heat shock induces eIF2alpha-phosphorylation-independent assembly of stress granules containing eIF3 and 40S ribosomal subunits in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of cell science*, 122(Pt 12), 2078–2088. <https://doi.org/10.1242/jcs.045104>
28. Grousl, T., Ivanov, P., Malcova, I., Pompach, P., Frydlova, I., Slaba, R., Senohrabkova, L., Novakova, L., & Hasek, J. (2013). Heat shock-induced accumulation of translation elongation and termination factors precedes assembly of stress granules in *S. cerevisiae*. *PloS one*, 8(2), e57083. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057083>
29. Grousl, T., Vojtova, J., Hasek, J., & Vomastek, T. (2021). Yeast stress granules at a glance. *Yeast* (Chichester, England), 10.1002/yea.3681. *Advance online publication*. <https://doi.org/10.1002/yea.3681>
30. Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M., & Binder, L. I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(13), 4913–4917. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.13.4913>
31. Hasegawa M. (2019). Structure of NFT: Biochemical Approach. *Advances in experimental medicine and biology*, 1184, 23–34. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9358-8_2
32. Heidary, G., & Fortini, M. E. (2001). Identification and characterization of the *Drosophila* tau homolog. *Mechanisms of development*, 108(1-2), 171–178. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(01\)00487-7](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(01)00487-7)
33. Hofmann, S., Cherkasova, V., Bankhead, P., Bukau, B., & Stoecklin, G. (2012). Translation suppression promotes stress granule formation and cell survival in response to cold shock. *Molecular biology of the cell*, 23(19), 3786–3800. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-04-0296>
34. Hofmann, S., Kedersha, N., Anderson, P., & Ivanov, P. (2021). Molecular mechanisms of stress granule assembly and disassembly. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, 1868(1), 118876. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118876>

35. Hoyle, N. P., Castelli, L. M., Campbell, S. G., Holmes, L. E., & Ashe, M. P. (2007). Stress-dependent relocalization of translationally primed mRNPs to cytoplasmic granules that are kinetically and spatially distinct from P-bodies. *The Journal of cell biology*, *179*(1), 65–74. <https://doi.org/10.1083/jcb.200707010>
36. Jain, S., Wheeler, J. R., Walters, R. W., Agrawal, A., Barsic, A., & Parker, R. (2016). ATPase-Modulated Stress Granules Contain a Diverse Proteome and Substructure. *Cell*, *164*(3), 487–498. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.038>
37. Janning, D., Igaev, M., Sündermann, F., Brühmann, J., Beutel, O., Heinisch, J. J., Bakota, L., Piehler, J., Junge, W., & Brandt, R. (2014). Single-molecule tracking of tau reveals fast kiss-and-hop interaction with microtubules in living neurons. *Molecular biology of the cell*, *25*(22), 3541–3551. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-06-1099>
38. Kato, K., Yamamoto, Y., & Izawa, S. (2011). Severe ethanol stress induces assembly of stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, *28*(5), 339–347. <https://doi.org/10.1002/yea.1842>
39. Kedersha, N. L., Gupta, M., Li, W., Miller, I., & Anderson, P. (1999). RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *The Journal of cell biology*, *147*(7), 1431–1442. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.7.1431>
40. Kedersha, N., Ivanov, P., & Anderson, P. (2013). Stress granules and cell signaling: more than just a passing phase?. *Trends in biochemical sciences*, *38*(10), 494–506. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.07.004>
41. Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fritzler, M. J., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Golan, D. E., & Anderson, P. (2005). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *The Journal of cell biology*, *169*(6), 871–884. <https://doi.org/10.1083/jcb.200502088>
42. Köpke, E., Tung, Y. C., Shaikh, S., Alonso, A. C., Iqbal, K., & Grundke-Iqbal, I. (1993). Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *The Journal of biological chemistry*, *268*(32), 24374–24384.
43. Kovacs G. G. (2016). Molecular Pathological Classification of Neurodegenerative Diseases: Turning towards Precision Medicine. *International journal of molecular sciences*, *17*(2), 189. <https://doi.org/10.3390/ijms17020189>
44. Kowall, N. W., & Kosik, K. S. (1987). Axonal disruption and aberrant localization of tau protein characterize the neuropil pathology of Alzheimer's disease. *Annals of neurology*, *22*(5), 639–643. <https://doi.org/10.1002/ana.410220514>
45. Kroschwald, S., Munder, M. C., Maharana, S., Franzmann, T. M., Richter, D., Ruer, M., Hyman, A. A., & Alberti, S. (2018). Different Material States of Pub1 Condensates Define Distinct Modes of Stress Adaptation and Recovery. *Cell reports*, *23*(11), 3327–3339. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.041>
46. Lauretti, E., & Praticò, D. (2015). Glucose deprivation increases tau phosphorylation via P38 mitogen-activated protein kinase. *Aging cell*, *14*(6), 1067–1074. <https://doi.org/10.1111/acer.12381>
47. Lauretti, E., Li, J. G., Di Meco, A., & Praticò, D. (2017). Glucose deficit triggers tau pathology and synaptic dysfunction in a tauopathy mouse model. *Translational psychiatry*, *7*(1), e1020. <https://doi.org/10.1038/tp.2016.296>
48. Loomis, P. A., Howard, T. H., Castleberry, R. P., & Binder, L. I. (1990). Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *87*(21), 8422–8426. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.21.8422>
49. Mahboubi, H., & Stochaj, U. (2017). Cytoplasmic stress granules: Dynamic modulators of cell signaling and disease. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, *1863*(4), 884–895. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.12.022>
50. Martin, L., Latypova, X., & Terro, F. (2011). Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease. *Neurochemistry international*, *58*(4), 458–471. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.12.023>
51. Maziuk, B. F., Apicco, D. J., Cruz, A. L., Jiang, L., Ash, P., da Rocha, E. L., Zhang, C., Yu, W. H., Leszyk, J., Abisambra, J. F., Li, H., & Wolozin, B. (2018). RNA binding proteins co-localize with small tau inclusions in tauopathy. *Acta neuropathologica communications*, *6*(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0574-5>
52. Molliex, A., Temirov, J., Lee, J., Coughlin, M., Kanagaraj, A. P., Kim, H. J., Mittag, T., & Taylor, J. P. (2015). Phase separation by low complexity domains promotes stress granule assembly and drives pathological fibrillization. *Cell*, *163*(1), 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.015>

53. Mukrasch, M. D., Bibow, S., Korukottu, J., Jeganathan, S., Biernat, J., Griesinger, C., Mandelkow, E., & Zweckstetter, M. (2009). Structural polymorphism of 441-residue tau at single residue resolution. *PLoS biology*, 7(2), e34. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000034>
54. Mukrasch, M. D., Biernat, J., von Bergen, M., Griesinger, C., Mandelkow, E., & Zweckstetter, M. (2005). Sites of tau important for aggregation populate {beta}-structure and bind to microtubules and polyanions. *The Journal of biological chemistry*, 280(26), 24978–24986. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501565200>
55. Neve, R. L., Harris, P., Kosik, K. S., Kurnit, D. M., & Donlon, T. A. (1986). 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 research*, 387(3), 271–280. [https://doi.org/10.1016/0169-328x\(86\)90033-1](https://doi.org/10.1016/0169-328x(86)90033-1)
56. Panas, M. D., Ivanov, P., & Anderson, P. (2016). Mechanistic insights into mammalian stress granule dynamics. *The Journal of cell biology*, 215(3), 313–323. <https://doi.org/10.1083/jcb.201609081>
57. Protter, D., & Parker, R. (2016). Principles and Properties of Stress Granules. *Trends in cell biology*, 26(9), 668–679. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.05.004>
58. Ramaswami, M., Taylor, J. P., & Parker, R. (2013). Altered ribostasis: RNA-protein granules in degenerative disorders. *Cell*, 154(4), 727–736. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.038>
59. RayChaudhuri D. (1999). ZipA is a MAP-Tau homolog and is essential for structural integrity of the cytokinetic FtsZ ring during bacterial cell division. *The EMBO journal*, 18(9), 2372–2383. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.9.2372>
60. Riggs, C. L., Kedersha, N., Ivanov, P., & Anderson, P. (2020). Mammalian stress granules and P bodies at a glance. *Journal of cell science*, 133(16), jcs242487. <https://doi.org/10.1242/jcs.242487>
61. Shah, K. H., Varia, S. N., Cook, L. A., & Herman, P. K. (2016). A Hybrid-Body Containing Constituents of Both P-Bodies and Stress Granules Forms in Response to Hypoosmotic Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS one*, 11(6), e0158776. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158776>
62. Silva, J. M., Rodrigues, S., Sampaio-Marques, B., Gomes, P., Neves-Carvalho, A., Dioli, C., Soares-Cunha, C., Mazuik, B. F., Takashima, A., Ludovico, P., Wolozin, B., Sousa, N., & Sotiropoulos, I. (2019). Dysregulation of autophagy and stress granule-related proteins in stress-driven Tau pathology. *Cell death and differentiation*, 26(8), 1411–1427. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0217-1>
63. Simons, A. L., Mattson, D. M., Dornfeld, K., & Spitz, D. R. (2009). Glucose deprivation-induced metabolic oxidative stress and cancer therapy. *Journal of cancer research and therapeutics*, 5 Suppl 1(Suppl 1), S2–S6. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.55133>
64. Spannli, S., Tereshchenko, M., Mastromarco, G. J., Ihn, S. J., & Lee, H. O. (2019). Biomolecular condensates in neurodegeneration and cancer. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 20(12), 890–911. <https://doi.org/10.1111/tra.12704>
65. Spillantini, M. G., Murrell, J. R., Goedert, M., Farlow, M. R., Klug, A., & Ghetti, B. (1998). Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(13), 7737–7741. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.13.7737>
66. Spitz, D. R., Sim, J. E., Ridnour, L. A., Galoforo, S. S., & Lee, Y. J. (2000). Glucose deprivation-induced oxidative stress in human tumor cells. A fundamental defect in metabolism?. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899, 349–362. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06199.x>
67. Su, W. C., & Harrison, P. M. (2020). Deep conservation of prion-like composition in the eukaryotic prion-former Pub1/Tia1 family and its relatives. *PeerJ*, 8, e9023. <https://doi.org/10.7717/peerj.9023>
68. Sündermann, F., Fernandez, M. P., & Morgan, R. O. (2016). An evolutionary roadmap to the microtubule-associated protein MAP Tau. *BMC genomics*, 17, 264. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2590-9>
69. Szabo, L., Eckert, A., & Grimm, A. (2020). Insights into Disease-Associated Tau Impact on Mitochondria. *International journal of molecular sciences*, 21(17), 6344. <https://doi.org/10.3390/ijms21176344>
70. Tashiro, K., Hasegawa, M., Ihara, Y., & Iwatsubo, T. (1997). Somatodendritic localization of phosphorylated tau in neonatal and adult rat cerebral cortex. *Neuroreport*, 8(12), 2797–2801. <https://doi.org/10.1097/00001756-199708180-00029>
71. Tiwari, S., Atluri, V., Kaushik, A., Yndart, A., & Nair, M. (2019). Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *International journal of nanomedicine*, 14, 5541–5554. <https://doi.org/10.2147/IJN.S200490>
72. Vanderweyde, T., Apicco, D. J., Youmans-Kidder, K., Ash, P., Cook, C., Lummertz da Rocha, E., Jansen-West, K., Frame, A. A., Citro, A., Leszyk, J. D., Ivanov, P., Abisambra, J. F., Steffen, M., Li, H., Petrucelli, L., & Wolozin, B. (2016). Interaction of tau with the RNA-Binding Protein TIA1

- Regulates tau Pathophysiology and Toxicity. *Cell reports*, 15(7), 1455–1466. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.045>
73. Vanderweyde, T., Yu, H., Varnum, M., Liu-Yesucevitz, L., Citro, A., Ikezu, T., Duff, K., & Wolozin, B. (2012). Contrasting pathology of the stress granule proteins TIA-1 and G3BP in tauopathies. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(24), 8270–8283. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1592-12.2012>
 74. Wallace, E. W., Kear-Scott, J. L., Pilipenko, E. V., Schwartz, M. H., Laskowski, P. R., Rojek, A. E., Katanski, C. D., Riback, J. A., Dion, M. F., Franks, A. M., Airoldi, E. M., Pan, T., Budnik, B. A., & Drummond, D. A. (2015). Reversible, Specific, Active Aggregates of Endogenous Proteins Assemble upon Heat Stress. *Cell*, 162(6), 1286–1298. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.041>
 75. Wang, Y., & Mandelkow, E. (2016). Tau in physiology and pathology. *Nature reviews. Neuroscience*, 17(1), 5–21. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.1>
 76. Wegmann S. (2019). Liquid-Liquid Phase Separation of Tau Protein in Neurobiology and Pathology. *Advances in experimental medicine and biology*, 1184, 341–357. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9358-8_25
 77. Wegmann, S., Eftekhazadeh, B., Tepper, K., Zoltowska, K. M., Bennett, R. E., Dujardin, S., Laskowski, P. R., MacKenzie, D., Kamath, T., Commins, C., Vanderburg, C., Roe, A. D., Fan, Z., Mollieux, A. M., Hernandez-Vega, A., Muller, D., Hyman, A. A., Mandelkow, E., Taylor, J. P., & Hyman, B. T. (2018). Tau protein liquid-liquid phase separation can initiate tau aggregation. *The EMBO journal*, 37(7), e98049. <https://doi.org/10.15252/embi.201798049>
 78. Williams D. R. (2006). Tauopathies: classification and clinical update on neurodegenerative diseases associated with microtubule-associated protein tau. *Internal medicine journal*, 36(10), 652–660. <https://doi.org/10.1111/j.1445-5994.2006.01153.x>
 79. Wolozin B. (2012). Regulated protein aggregation: stress granules and neurodegeneration. *Molecular neurodegeneration*, 7, 56. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-7-56>
 80. Wolozin B. (2014). Physiological protein aggregation run amuck: stress granules and the genesis of neurodegenerative disease. *Discovery medicine*, 17(91), 47–52.
 81. Wolozin, B., & Ivanov, P. (2019). Stress granules and neurodegeneration. *Nature reviews. Neuroscience*, 20(11), 649–666. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0222-5>
 82. Yang, X., Shen, Y., Garre, E., Hao, X., Krumlinde, D., Cvijović, M., Arens, C., Nyström, T., Liu, B., & Sunnerhagen, P. (2014). Stress granule-defective mutants deregulate stress responsive transcripts. *PLoS genetics*, 10(11), e1004763. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004763>
 83. Wolozin B. (2012). Regulated protein aggregation: stress granules and neurodegeneration. *Molecular neurodegeneration*, 7, 56. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-7-56>