

CONDENSADOS BIOMOLECULARES: ORGANIZADORES DE LA VIDA

por MARÍA HEREDIA TORREJÓN, ALFONSO MARÍA LECHUGA SANCHO Y RAÚL MONTAÑEZ MARTÍNEZ

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN BIOMÉDICA DE CÁDIZ (INIBICA).

Resumen: La vida nunca deja de sorprendernos. Hoy lo hace con unos orgánulos libres de membrana conocidos como condensados biomoleculares. Éstos, son el resultado de un fenómeno de autoorganización de biomoléculas capaz de crear auténticos microentornos con funciones definidas en el interior de la célula. En los últimos años, se ha descubierto que los condensados desempeñan un papel relevante en diversos aspectos de la biología celular, como la regulación de la expresión génica, la síntesis de proteínas, el control de la señalización celular, la polimerización de proteínas del citoesqueleto o la formación de agregados asociados a enfermedades neurodegenerativas, entre muchas otras aún por descubrir. Estos hallazgos están desafiando nuestra comprensión actual de los procesos celulares y ofrecen nuevas maneras de entender el funcionamiento interno de las células. Los condensados muestran mecanismos celulares previamente desconocidos, mucho más estocásticos y que diluyen la preponderancia del mecanicismo genético en favor de los procesos de autoorganización celular. El avance en la comprensión de los condensados biomoleculares abre emocionantes vías de investigación en biología celular y molecular y permiten la reinterpretación de los procesos que relacionan el genotipo y el fenotipo, ofreciendo así la posibilidad de comprender mejor las enfermedades y desarrollar enfoques terapéuticos más efectivos en el futuro.

Abstract: *Life never fails to surprise us. Today, it does so with membrane-less organelles known as biomolecular condensates. These structures arise from a phenomenon of biomolecular self-organization capable of generating localized microenvironments with defined functions within the cell. In recent years, the significance of condensates in various aspects of cellular biology has been unveiled, including the regulation of gene expression, protein synthesis, cellular signaling control, cytoskeletal protein polymerization, and the formation of aggregates associated with neurodegenerative diseases, among many others yet to be discovered. These findings are revolutionizing our current understanding of cellular processes and providing new insights into cell process regulation. Condensates unveil previously unknown cellular mechanisms, more stochastic, that are shifting away from the dominance of genetic mechanisms in favor of cellular self-organization processes. The advancement in comprehending biomolecular condensates paves the way for exciting avenues of research in cellular and molecular biology, enabling the reinterpretation of processes that relate the genotype to the phenotype. Offering, in this way, the potential to better understand diseases and develop more effective therapeutic approaches in the future.*

Palabras clave: Condensados Biomoleculares, separación de fases líquido-líquido, autoorganización, biología estructural, salud humana.

Keywords: *Biomolecular condensates, liquid-liquid phase separation, self-organization, structural biology, human health.*

¿Qué es un condensado biomolecular?:

Imaginad una célula, la mínima unidad de la vida. Pese a la simplicidad del anterior enunciado, cada célula humana alberga en su interior unas 6 millones de proteínas, 67 millones de transcritos de distintos ARNs y toda una miríada de otras moléculas. Además, cada una de ellas, presenta diferentes grados de hidrofobicidad, carga relativa y tendencia a interactuar o repelerse. En un citoplasma tan concurrido y reactivo, cualquier pequeña perturbación

rápidamente se propaga. ¿Cómo logran las células coordinar tan caótico citoplasma y llevar a cabo sus funciones? En realidad, el contenido intracelular presenta una gran organización. Retículos, mitocondrias, endosomas o vesículas de secreción y otros orgánulos, encierran los componentes citoplasmáticos mediante bicapas lipídicas o los anclan a su superficie. Pero esta es sólo una de las posibles fuentes de orden. Ahora sabemos que las células también forman otro tipo de compartimentos mediante la interacción espontánea y transitoria de sus proteínas y ácidos nucleicos. Estos compartimentos conforman auténticos orgánulos

los libres de membrana conocidos como condensados biomoleculares (CBs)^[1].

Gracias a los CBs, las células agrupan componentes citoplasmáticos implicados en una tarea común. Así, minimizan las interacciones indeseadas con otras moléculas favoreciendo la eficiencia y especificidad de las reacciones. Al no verse encerrados por una membrana, estos orgánulos intercambian sus compo-

ponentes con el citoplasma circundante sin necesidad de transportadores específicos^[2] y son capaces de percibir y adaptarse rápidamente a las condiciones cambiantes de su entorno (Figura 1A). Esta regionalización dinámica permite el control coordinado de las millones de reacciones celulares y explicaría la sorprendente velocidad de los procesos celulares.

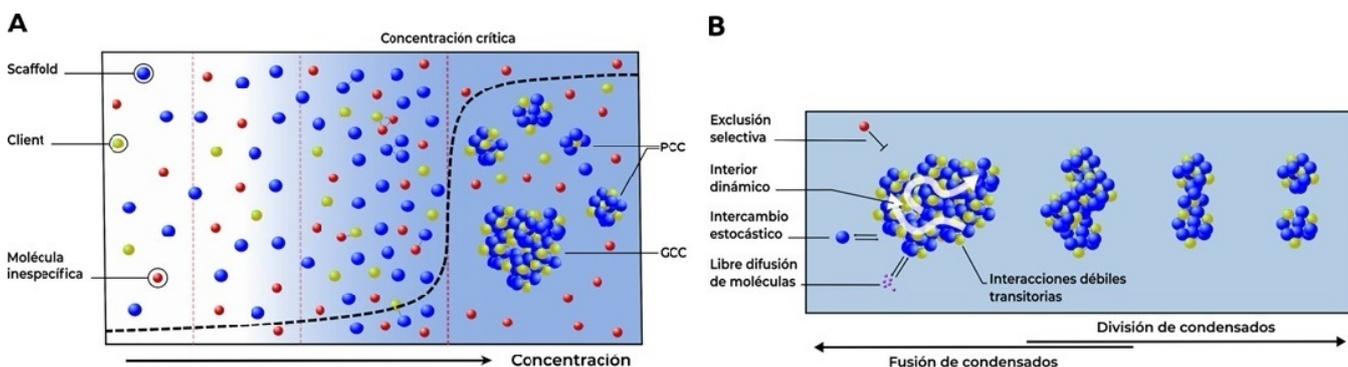


Figura 1: Representación del proceso de LLPS. **A)** A partir de un determinado umbral de concentración, proteínas y ácidos nucleicos establecen interacciones débiles transitorias que provocan la separación de fases, dando lugar a una fase densa (condensado biomolecular) y a una fase diluida (citoplasma celular). Estas interacciones se producen entre determinados componentes, excluyendo al resto del microentorno. (PCC) Pequeños condensados conexos, (GCC) Gran condensado conexo. **B)** Representación de la naturaleza dinámica de los CBs. La naturaleza de las interacciones definen la dinámica de las moléculas del interior del condensado. Principalmente adquieren una consistencia semilíquida en la que las moléculas difunden libremente en el interior del condensado, pudiendo intercambiarse con las del citoplasma circundante. Esta naturaleza dinámica permite a las gotas fluir, fusionarse o separarse.

Separación de Fases Líquido-Líquido:

Aunque se conocen diversos mecanismos implicados en la formación de CBs, los datos experimentales han demostrado que la separación de fases líquido-líquido (LLPS)^[3] tiene un papel destacado. En la célula, la LLPS es un proceso termodinámico pasivo y reversible que se produce mediante el establecimiento de interacciones débiles entre componentes. Como resultado, estos componentes se agrupan en una fase densa, diluyendo así su entorno próximo (Figura 1A). Tal como sucedería al mezclar agua y aceite, la tensión superficial provoca que la fase densa adopte forma de gota^[4,5]. Capaces de fluir, fusionarse o separarse, estas gotas conforman verdaderos microentornos que existen de forma estable en las células (Figura 1B).

Este proceso termodinámico permite minimizar la energía libre de una región del sistema. Descomponiendo la energía libre (G) en sus componentes entálpicos (H) y entrópicos (S), $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, vemos que la disminución entrópica que supone la reducción en el número de microestados causado por la condensación ha de ser compensada por la continua

formación de interacciones débiles que favorecen la minimización de energía libre mediada por el término entálpico. Así pues, el número y la fuerza de esas interacciones van a determinar la probabilidad de condensación a una temperatura dada y la estabilidad del condensado^[6,7].

La microcompartimentalización celular mediada por LLPS fue propuesta en 1995 por Walter y Brooks^[8], pero no fue hasta 2009 que esta teoría ganó relevancia tras demostrar Brangwynne y su equipo que los gránulos-P de las células germinales en *Caenorhabditis elegans*, se forman mediante LLPS^[9]. Posteriormente, el equipo de Michael K. Rosen demostró la separación de fases en proteínas de señalización y ofreció las primeras evidencias experimentales de interacciones multivalentes en proteínas^[10]. Desde entonces, los trabajos mostrando la relevancia de los condensados a diferentes escalas, están creciendo exponencialmente^[11].

¿Cuáles son los determinantes físico-químico-biológicos de la LLPS?:

A pesar de todos los avances en el campo, todavía

no se tiene certeza sobre los mecanismos moleculares que gobiernan la LLPS. Sabemos que se pueden diferenciar dos amplios grupos de moléculas que forman parte de un CB: las denominadas *scaffolds*, que dirigen su formación a través de interacciones multivalentes entre ellas; y las *clients*, que se incorporarían a *posteriori* a la red nucleada por las primeras. La abundancia relativa de *scaffolds* y *clients* y la valencia de cada una de ellas va a determinar la conectividad de la red líquida que regula su estabilidad y tamaño^[6]. La restricción de tamaño de los condensados podría estar regulada activamente por la célula, controlando la tasa de producción y degradación de moléculas que los conforman. Así mismo, las bicapas son capaces de regular la localización y formación de condensados, anclando moléculas implicadas y disminuyendo la concentración a la cual se produce la separación de fases, al mantenerlas en un entorno localizado^[5,12].

Las interacciones entre *scaffolds* se darían tanto a través de dominios estructurados, p.ej.: dominios de reconocimiento de RNA, de unión a DNA o de homo/hetero dimerización; como de las regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs) de las proteínas^[13]. Sin embargo, los actores principales de la separación de fases, parecen ser las interacciones multivalentes transitorias mediadas por las IDRs. Estas regiones se caracterizan por la ausencia de una estructura

tridimensional bien definida, oscilando en un amplio rango de conformaciones. A pesar de ocupar un papel central en el campo de los CBs, las dificultades experimentales que conlleva su estudio limita nuestro conocimiento sobre ellas. Con la tecnología actual, se ha podido estimar que hasta el 43.6% del proteoma humano está conformado por IDRs^[14], que se caracterizan por presentar regiones de baja complejidad (RBC), y dominios priónicos (DP). Estas RBCs y DPs tienen una composición aminoacídica particular, que además, ocupan una posición específica dentro de la secuencia primaria. De esta manera, podemos ver que se trata de regiones enriquecidas en aminoácidos que promueven el desorden, como glicina y prolina; y aminoácidos con carga positiva como la arginina, que favorecen el establecimiento de interacciones polares. Los anteriores aminoácidos, se encuentran espaciados por residuos aromáticos como la tirosina, que favorecen las interacciones $\pi - \pi$ o $\pi - sp^2$; formando motivos repetitivos como: [S/N/G]Y[S/N/G], RGG/RG, FG^[13]. Así mismo, variaciones en los parámetros ambientales (pH, gradientes salinos, temperatura...), en la concentración de sus componentes e incluso modificaciones químicas o estructurales (como modificaciones post traduccionales), comportan cambios en la composición y propiedades físicas de los CBs.

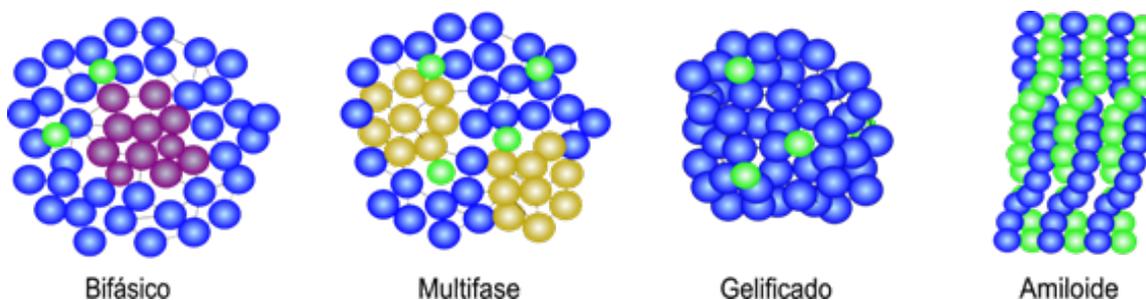


Figura 2: Diferentes tipos de CBs en función de sus propiedades materiales. A diferencia de los condensados con propiedades líquidas, los condensados gelificados y amiloides forman estructuras no dinámicas y a menudo, insolubles.

Propiedades materiales:

Los CBs tienen apariencia de gota, pero debido a su naturaleza, estas no son simples gotas homogéneas en las que se observan interacciones isotrópicas, sino que más bien, siguen la dinámica de los *network fluids*. Como introducíamos antes, en este tipo de fluidos, las partículas establecen interacciones anisotrópicas, formando estructuras mesoscópicas que van más allá de la escala molecular, conformando redes de polímeros que presentan cadenas y ramificaciones^[15]. Sus propiedades reológicas vienen determinadas pre-

cisamente por el número de interacciones y la escala temporal a la que se producen o rompen estas interacciones, el número de sitios de interacción en las moléculas de la fase densa y las acciones moduladoras del resto de la secuencia. Es por ello que estos fluidos no son puramente viscosos, sino que pueden comportarse como materiales viscoelásticos. Esto se traduce en que en el interior de los CBs se pueden formar diferentes redes de interacción que conforman multicapas con diferentes propiedades reológicas, p.e.: viscosidad, tensión superficial, porosidad^[16]. De este modo, las propiedades materiales de los condensados conforman así mismo, todo un nuevo campo de in-

vestigación, pudiendo encontrarse gran diversidad de clases: *gelled condensates*, *amyloid fibers*, *glassy-like assemblies*, etc.^[14] (Figura 2). Un caso paradigmático es el de la esclerosis lateral amiotrófica, donde se ha visto que la mutación patogénica G156E, que recae sobre un DP de unión a ARN de la proteína FUS, muestra una mayor tendencia a formar agregados, cambiando las propiedades líquidas del condensado, que forma un agregado sólido de fibras^[17].

Condensados en múltiples escalas de regulación:

La complejidad inherente a la vida se resiste a nuestro entendimiento. Diseccionando sus propiedades individuales, se han conseguido numerosos progresos en la comprensión de los procesos celulares. Sin embargo, ante estos nuevos mecanismos de regulación de la función celular, la interpretación clásica de los mapas de reacciones interconectadas y coordinadas mediante optimizaciones evolutivas de afinidad y especificidad se desdibuja. El complejo campo de los CBs, nos obliga a aceptar que nuevas propiedades emergen como resultado de la interacción de sus componentes a múltiples escalas. Este nuevo nivel de complejidad que aportan los CBs, ofrece un nuevo y apasionante paisaje por explorar. La novedad en la interpretación del funcionamiento celular basada en CBs radica en que la función emerge del comportamiento colectivo y autoorganizado de las moléculas, que se ensamblan como unidades de computación temporal. Así, estas moléculas acceden a estados de

respuesta en función del *status quo* celular, compitiendo entre ellas por la consolidación de procesos que imposibilitan otros. Quizás, ahí esté la réplica a los tan elusivos mecanismos de memoria celular, alterando así lo que creíamos saber sobre la gestión celular de la información.

Aunque queda mucho trabajo por hacer, la relevancia de los CBs como organizadores de la bioquímica celular es ya un hecho aceptado^[11,18], y se ha demostrado su papel en la patofisiología de múltiples enfermedades^[19,20,21,22]. En el contexto de una enfermedad, definimos una 'condensadopatía' como la formación de un CB aberrante causante de un fenotipo patológico específico. Se han observado CBs patológicos en varios sistemas de estudio de enfermedades neurodegenerativas, miocardiopatías, ciertos tipos de cáncer, infecciones virales y enfermedades raras^[23,24] (Figura 3). Gracias a estos estudios, sabemos que los CBs cumplen funciones clave a múltiples escalas. A nivel molecular, regulan la actividad de vías de señalización a través de la concentración o exclusión de componentes específicos, el plegamiento de las macromoléculas o la organización vectorial de reacciones bioquímicas. Lo que recuerda mucho al concepto de canalización metabólica propuesto por Agius y Sherratt en 1997^[25]. A nivel de mesoescala, donde las moléculas forman estructuras más complejas, se ha visto que los condensados servirían para diseñar su arquitectura, como hacen por ejemplo en las densidades post-sináptica^[26] o los centriolos^[27]. Por último, a nivel celular, se encargan de mantener la arquitectura subcelular, por ejemplo, manteniendo el estado de la heterocromatina^[4].

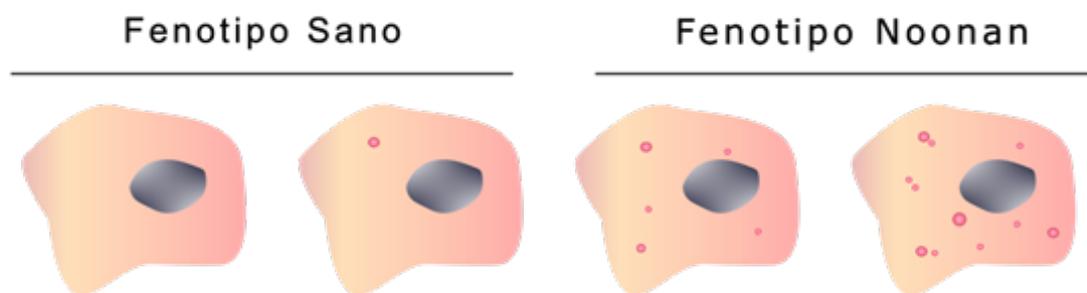


Figura 3: Fenotipo característico de una condensadopatía. Los individuos sanos presentan un reducido número de condensados biomoleculares, mientras que aquellos con síndrome de Noonan muestran un incremento notable.

Sin entrar en mayor profundidad, podemos hacernos una idea del delicado equilibrio entre los parámetros físico-químico-biológicos que intervienen en la separación de fases. Alteraciones de este equilibrio podrían conducir a estados patológicos a través de

perturbaciones en la formación^[10], propiedades materiales^[17], localización^[29] o composición^[30] de estos CBs^[24]. Esto ha hecho que en la última década, se invierta un gran esfuerzo en la investigación de estos CBs, dando lugar a un conjunto de herramientas

que posibilitan su estudio. La incorporación de estas herramientas en colaboración con la mejora y abaratamiento de otras tecnologías, va permitiendo coger impulso y conseguir su despegue científico. Así, se ha podido estimar que existen unas 36 000 variantes genéticas causantes de enfermedades mendelianas y diferentes tipos de cáncer, cuya patogénesis estaría directamente relacionada con la alteración de CBs^[24]. Por no hablar ya de la relevancia de estos en la elucidación de la significancia clínica de las variantes

de significado incierto que actualmente se acumulan en el sistema sanitario, fruto de nuestro desconocimiento. Este asunto será nuestro objeto de debate en el próximo número donde revisaremos el papel de los CBs en la fisiopatología de diversas enfermedades. Es apasionante ver como las manchas del leopardo se van difuminando^[31] a medida que comprendemos cada vez un poco más del carácter “social” del comportamiento celular.

Referencias

- [1] Fare, C. M., Villani, A., Drake, L. E. & Shorter, J. Higher-order organization of biomolecular condensates. *Open Biol.* 11, 210137 (2021).
- [2] Poudyal, R. R., Pir Cakmak, F., Keating, C. D. & Bevilacqua, P. C. Physical Principles and Extant Biology Reveal Roles for RNA-Containing Membraneless Compartments in Origins of Life Chemistry. *Biochemistry* 57, 2509–2519 (2018).
- [3] Banani, S. F., Lee, H. O., Hyman, A. A. & Rosen, M. K. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 285–298 (2017).
- [4] Liu, X. et al. Mitotic Implantation of the Transcription Factor Prospero via Phase Separation Drives Terminal Neuronal Differentiation. *Dev. Cell* 52, 277–293.e8 (2020).
- [5] Case, L. B. Membranes regulate biomolecular condensates. *Nature cell biology* vol. 24 404–405 (2022).
- [6] Espinosa, J. R. et al. Liquid network connectivity regulates the stability and composition of biomolecular condensates with many components. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117, 13238–13247 (2020).
- [7] Falahati, H. & Haji-Akbari, A. Thermodynamically driven assemblies and liquid-liquid phase separations in biology. *Soft Matter* 15, 1135–1154 (2019).
- [8] Walter, H. & Brooks, D. E. Phase separation in cytoplasm, due to macromolecular crowding, is the basis for microcompartmentation. *FEBS Lett.* 361, 135–139 (1995).
- [9] Brangwynne, C. P. et al. Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation. *Science* 324, 1729–1732 (2009).
- [10] Li, P. et al. Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins. *Nature* 483, 336–340 (2012).
- [11] Lyon, A. S., Peeples, W. B. & Rosen, M. K. A framework for understanding the functions of biomolecular condensates across scales. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 22, 215–235 (2021).
- [12] Zhang, H. et al. A subcellular map of the human kinome. *Elife* 10, (2021).
- [13] Schuster, B. S. et al. Biomolecular Condensates: Sequence Determinants of Phase Separation, Microstructural Organization, Enzymatic Activity, and Material Properties. *J. Phys. Chem. B* 125, 3441–3451 (2021).
- [14] Tsang, B., Pritišanac, I., Scherer, S. W., Moses, A. M. & Forman-Kay, J. D. Phase Separation as a Missing Mechanism for Interpretation of Disease Mutations. *Cell* 183, 1742–1756 (2020).
- [15] Dias, C. S., Araújo, N. A. M. & Telo da Gama, M. M. Dynamics of network fluids. *Adv. Colloid Interface Sci.* 247, 258–263 (2017).
- [16] Choi, J.-M., Holehouse, A. S. & Pappu, R. V. Physical Principles Underlying the Complex Biology of Intracellular Phase Transitions. *Annu. Rev. Biophys.* 49, 107–133 (2020).
- [17] Patel, A. et al. A Liquid-to-Solid Phase Transition of the ALS Protein FUS Accelerated by Disease Mutation. *Cell* 162, 1066–1077 (2015).
- [18] Zeng, M. et al. Reconstituted Postsynaptic Density as a Molecular Platform for Understanding Synapse Formation and Plasticity. *Cell* 174, 1172–1187.e16 (2018).
- [19] Nedelsky, N. B. & Taylor, J. P. Bridging biophysics and neurology: aberrant phase transitions in neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurol.* 15, 272–286 (2019).
- [20] Tulpule, A. et al. Kinase-mediated RAS signaling via membraneless cytoplasmic protein granules. *Cell* 184, 2649–2664.e18 (2021).
- [21] Wang, L. et al. Rett syndrome-causing mutations compromise MeCP2-mediated liquid-liquid phase separation of chromatin. *Cell Res.* 30, 393–407 (2020).
- [22] Alberti, S. & Hyman, A. A. Biomolecular condensates at the nexus of cellular stress, protein aggregation disease and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 22, 196–213 (2021).
- [23] Mitrea, D. M., Mittasch, M., Gomes, B. F., Klein, I. A. & Murcko, M. A. Modulating biomolecular condensates: a novel approach to drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 21, 841–862 (2022).
- [24] Banani, S. F. et al. Genetic variation associated with condensate dysregulation in disease. *Dev. Cell* 57, 1776–1788.e8 (2022).
- [25] Agius, L. Channelling in Intermediary Metabolism. (Ashgate Publishing, 1997).
- [26] Wu, X., Cai, Q., Feng, Z. & Zhang, M. Liquid-Liquid Phase Separation in Neuronal Development and Synaptic Signaling. *Dev. Cell* 55, 18–29 (2020).
- [27] Park, J.-E. et al. Phase separation of Polo-like kinase 4 by autoactivation and clustering drives centriole biogenesis. *Nat. Commun.* 10, 4959 (2019).
- [28] Zhu, G. et al. Phase Separation of Disease-Associated SHP2 Mutants Underlies MAPK Hyperactivation. *Cell* 183, 490–502.e18 (2020).
- [29] Boulay, G. et al. Cancer-Specific Retargeting of BAF Complexes by a Prion-like Domain. *Cell* 171, 163–178.e19 (2017).
- [30] Basu, S. et al. Unblending of Transcriptional Condensates in Human Repeat Expansion Disease. *Cell* 181, 1062–1079.e30 (2020).
- [31] Goodwin, B. Las Manchas Del Leopardo: La Evolución de la Complejidad. (*Tusquets Editores*, 1998).