

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

Desarrollo de nuevas herramientas para la detección e inhibición de la amiloidosis causada por el prionoide RepA-WH1 en *Escherichia coli* y caracterización de su toxicidad

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Laura Molina García

Director

Rafael Giraldo Suárez

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**Desarrollo de nuevas herramientas para la detección e
inhibición de la amiloidosis causada por el prionoide**

**RepA-WH1 en *Escherichia coli*
y caracterización de su toxicidad**

Tesis Doctoral



Laura Molina García

Madrid, 2015

Desarrollo de nuevas herramientas para la detección e inhibición de la amiloidosis causada por el prionoide RepA-WH1 en *Escherichia coli* y caracterización de su toxicidad

Tesis Doctoral presentada por la Lda. Laura Molina García, para optar al grado de Doctor con mención Europea por la Universidad Complutense de Madrid.



El trabajo ha sido realizado en el Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CIB-CSIC) bajo la dirección del Doctor Rafael Giraldo Suárez y financiado por el programa de Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España (BES-2010-033442/BIO2009-06952).



Madrid, 2015

Lda. Laura Molina García

VºBº Director de Tesis
Dr. Rafael Giraldo Suárez

A mis padres y mi hermana

A mi abuelo Luis

"What I can not create I do not understand"

(Richard Feynman)

"La imaginación es más importante que el conocimiento"

(Albert Einstein)

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	V
ABREVIATURAS	VIII
<u>I. SUMMARY</u>	1
<u>II. INTRODUCCIÓN</u>	9
1. Bases moleculares y estructurales de la agregación amiloide	11
1.1. Estructura de amiloides	11
1.2. Polimorfismo estructural en amiloides: variantes y estirpes.....	13
1.3. Propagación: Transformación del estado nativo al estado amiloide.	14
2. Biología del estado amiloide: amiloides funcionales y amiloidosis	16
2.1. Priones y prionoides.....	16
2.2. Amiloides funcionales.....	17
2.3. Proteinopatías amiloides.....	19
3. Mecanismos de toxicidad amiloide	23
4. Sistemas modelo para el estudio de las amiloidosis	24
4.1. Sistemas modelo de amiloidosis en animales	25
4.2. Levaduras: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . El prion [PSI ⁺]	27
4.3. Bacterias: <i>Escherichia coli</i>	29
5. La proteína RepA-WH1 del plásmido pPS10 de <i>Pseudomonas</i>: Un modelo de amiloidosis en bacterias	31
5.1. La proteína RepA en la replicación del plásmido pPS10	31
5.2. RepA-WH1, el primer prionoide sintético bacteriano.	33
<u>III. OBJETIVOS</u>	41
<u>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</u>	45
A. MATERIALES	47
1. Estirpes bacterianas	47
2. Plásmidos	48
3. Medios de cultivo bacterianos	48
4. Reactivos	48
4.1. Enzimas de modificación del ADN.....	48
4.2. Oligonucleótidos	50
4.3. Secuenciación de ADN	52
4.4. Purificación de fragmentos de ADN.....	52

4.5. Proteínas	53
4.6. Anticuerpos.....	53
4.7. Microscopía.....	53
4.8. Otros.....	54
B. MÉTODOS	54
1. Manipulación del ADN.....	54
1.1. Células competentes y transformación de <i>E. coli</i>	54
1.1.1. Choque térmico.....	54
1.1.2. Electroporación	54
1.2. Extracción de ADN	55
1.2.1. ADN plásmidico	55
1.2.2. ADN genómico.....	55
1.3. Construcción de vectores de expresión	55
1.3.1. Construcción de las fusiones WH1 (Δ /WT/A31V/ Δ N37)-mCherry/ YFP	55
1.3.2. Construcción de las quimeras WH1(R1-4)-RF1	57
1.3.3. Construcción de los vectores pFus- <i>lacZ</i> (WT/ámbar).....	58
1.3.4. Construcción de la estirpe MRA8 Δ <i>lacZ</i>	59
2. Métodos relativos a la coagregación de variantes de RepA-WH1.....	60
2.1. Crecimiento y fijación de bacterias.....	60
2.2. Microscopía de epifluorescencia.....	61
2.3. Detección y cuantificación de proteínas: <i>Western-blot</i> y <i>SDD-AGE</i>	61
3. Métodos relativos a las aproximaciones “ómicas” para la caracterización de la toxicidad del prionoide RepA-WH1(A31V) en <i>E. coli</i>	62
3.1. Crecimiento bacteriano.....	62
3.2. Extracción del ARN.....	62
3.3. Análisis transcriptómico de la respuesta de <i>E. coli</i> al prionoide RepA-WH1	63
3.4. Análisis proteómico de la fracción insoluble purificada.....	63
3.5. Comparación de análisis transcriptómico y proteómico.....	65
3.6. Valoración de los niveles de hierro. Ensayo de ferrocina.....	65
3.7. Transporte dependiente de H ⁺ : Incorporación de gentamicina.....	66
3.8. Valoración de la respiración aerobia: Consumo de oxígeno	66
3.9. Sensibilidad a especies reactivas de oxígeno (ROS)	67
3.9.1. H ₂ O ₂ y paraquat (O ₂ ⁻).....	67

3.9.2. Hyper-3	67
3.10. Valoración de los niveles de ATP	67
4. Métodos relativos al prionoide quimera WH1(R1-4)-RF1	68
4.1. Crecimiento bacteriano	68
4.2. Ensayos de complementación del crecimiento en MRA8 Δ lacZ	68
4.3. Ensayos de lectura corrida de codones de terminación prematuros.....	68
4.4. Ensayos de actividad β -galactosidasa.....	69
4.5. Detección de las quimeras: <i>Western-blot</i> y <i>SDD-AGE</i>	70
<u>V. RESULTADOS</u>	71
1. Coagregación de variantes de RepA-WH1	73
1.1. La expresión de distintas variantes de RepA-WH1 da lugar a fenotipos diversos en <i>E. coli</i>	73
1.2. Coexpresión de las variantes RepA-WH1 (wt, A31V y Δ N37): Nucleación condicionada de la variante WH1(wt)	75
2. Caracterización de las vías de toxicidad del prionoide RepA-WH1 en <i>E. coli</i>	80
2.1. El patrón de expresión génica de las células en las que se propaga RepA-WH1(A31V) es distinto al de la variante Δ N37.....	80
2.2. Co-agregación diferencial de los agregados A31V y Δ N37 con el proteoma de <i>E. coli</i>	81
2.3. Identificación de potenciales dianas celulares mediante comparación de resultados “ómicos”	85
2.4. Validación mediante ensayos funcionales de los procesos celulares inferidos de los resultados “ómicos”.....	87
2.4.1. La expresión del mutante hiperamiloidogénico RepA-WH1(A31V) reduce el consumo de oxígeno (respiración aerobia) en <i>E. coli</i>	87
2.4.2. La expresión de RepA-WH1(A31V) conlleva una disminución de los niveles de ATP celular.....	89
2.4.3. La expresión del mutante A31V afecta al transporte a través de la membrana.....	89
2.4.4. La expresión del prionoide RepA-WH1(A31V) reduce la respuesta de detoxificación de H ₂ O ₂	91
2.4.5. La expresión de la variante hiperamiloidogénica de RepA-WH1(A31V) afecta a la captación de hierro	94
3. Prionoides quimera WH1(R1-4)-RF1.....	96
3.1. Diseño de un sistema de cribado de amiloidosis en <i>E. coli</i> basado en la agregación de RF1.....	96

3.2. Las quimeras WH1(R1-4)-RF1 complementan la deficiencia de <i>prfA</i> en <i>E. coli</i> MRA8.....	98
3.3. La expresión de las quimeras WH1(R2-4)-RF1 resulta en la lectura corrida de un codón de terminación UAG prematuro	100
3.4. La expresión de WH1(R2-4)-RF1 produce una ralentización del metabolismo en <i>E. coli</i> MRA8 a 42°C.....	101
3.5. La lectura corrida del codón de terminación prematuro UAG se debe a la agregación de las quimeras WH1(R2-4)-RF1.....	103
3.6. El tratamiento con resveratrol recupera la función de terminación de la traducción en las quimeras WH1(R2-4)-RF1.....	105
<u>VI. DISCUSIÓN</u>	113
1. Co-agregación de variantes de RepA-WH1.....	115
1.1. Relación fenotipo-amiloidogénesis en variantes de RepA-WH1.....	115
1.2. Nucleación cruzada <i>in vivo</i> y gradación del potencial amiloide de las variantes de RepA-WH1: A31V>ΔN37>>WT.....	116
2. Caracterización de las vías de toxicidad del prionoide RepA-WH1(A31V).....	120
2.1. Daño en la membrana interna: Evento primario de la citotoxicidad causada por el prionoide RepA-WH1(A31V)	120
2.2. La expresión de A31V reduce los niveles de ATP y aumenta la sensibilidad a H ₂ O ₂	121
2.3. La expresión del mutante A31V reduce la captación de hierro y con ello sus niveles intracelulares	122
2.4. Generación del radical hidroxilo: “Punto de no retorno” en la amiloidosis causada por RepA-WH1(A31V).....	123
2.5. RepA-WH1(A31V): Un sistema modelo de amiloidosis a nivel mitocondrial	124
3. Prionoides quimera WH1(R0-4)-RF1.....	127
3.1. Los niveles de las quimeras WH1(Rn)-RF1 son similares a los de la proteína RF1(WT) en condiciones fisiológicas	127
3.2. Prionoides quimera WH1(Rn)-RF1: Un nuevo ensayo sintético para la detección <i>in vivo</i> de secuencias con potencial amiloide en <i>E. coli</i>	128
3.3. La agregación de las quimeras WH1(R2-4)-RF1 modula la terminación de la traducción en el codón prematuro UAG.....	136
3.4. Acción moduladora del resveratrol sobre la agregación amiloide de WH1(R2-4)-RF1 en <i>E. coli</i>	137
<u>VII. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS</u>	141
<u>VIII. BIBLIOGRAFÍA</u>	145

TABLAS

Tabla 1: Priones, prionoides y amiloides funcionales.....	20
Tabla 2: Estirpes bacterianas.....	47
Tabla 3: Plásmidos.....	49
Tabla 4: Oligonucleótidos.....	51
Tabla 5: Media del número de células sin y con distinto número de agregados amiloides.....	77
Tabla 6: Valores absolutos de actividad β -galactosidasa de células MRA8 Δ lacZ expresando las quimeras WH1(Rn)-RF1 en combinación con el reportero lacZ-ámbar, en presencia y ausencia de resveratrol.....	109

FIGURAS

Figura 1: Estructura genérica de las fibras amiloides.....	12
Figura 2: Tipos de ensamblajes 3D de protofibras amiloides	13
Figura 3: Mecanismos de inducción del estado amiloide	15
Figura 4: Cinética de la agregación amiloide.	16
Figura 5: Ejemplos de amiloides funcionales.....	18
Figura 6: Depósitos de distintas proteínas amiloides ($A\beta$, Tau y α -sinucleína) y progresión de las distintas patologías neurodegenerativas.....	22
Figura 7: Tabla comparativa de las principales características de distintos sistemas modelo para el estudio de enfermedades neurodegenerativas.....	26
Figura 8: Esquema del funcionamiento y la organización estructural de Sup35p	28
Figura 9: Esquema del replicón del plásmido pPS10.	32
Figura 10: Dinámica de conversión de dímero a monómero de RepA.	33
Figura 11: Caracterización biofísica de la naturaleza amiloide de RepA-WH1(A31V).....	36
Figura 12: Rutas alternativas propuestas para la amiloidosis de RepA-WH1(A31V).	37
Figura 13: Modelo de los cambios conformacionales que sufre RepA-WH1(A31V) durante la amiloidogénesis.....	38
Figura 14: Identificación <i>in vivo</i> de la amiloidosis producida por RepA-WH1	39
Figura 15: Esquema de la construcción de las quimeras WH1(R0-4)-RF1	58
Figura 16: Construcción de la estirpe MRA8 Δ lacZ.....	60
Figura 17: Fórmulas químicas de los compuestos polifenólicos utilizados	69

Figura 18: Expresión en <i>E. coli</i> MDS42 de las variantes de RepA-WH1(WT, A31V y ΔN37) fusionadas a mCherry/YFP.	74
Figura 19: Coexpresión de las distintas variantes de RepA-WH1 fusionadas a mRFP/YFP..	76
Figura 20: Coexpresión de mRFP ó YFP con las distintas variantes RepA-WH1 (WT, A31V o ΔN37) fusionadas con el reportero fluorescente complementario	79
Figura 21: Perfil electroforético del ARN extraído antes de su hibridación con los <i>microchips</i>	81
Figura 22: Listado de genes cuya expresión se encontraba alterada en el estudio transcriptómico.....	83
Figura 23: Esquema del proceso de purificación de la fracción insoluble del proteoma de <i>E. coli</i> y listado de las proteínas de dicha fracción que co-agregan con A31V	84
Figura 24: Representación obtenida al analizar los datos de genómica y proteómica utilizando el servidor <i>EcoCyc</i>	86
Figura 25: Diagrama de <i>String</i> representando en 8 clústeres funcionales las 32 potenciales dianas celulares comunes identificadas mediante genómica y proteómica para RepA-WH1(A31V).....	87
Figura 26: Media del consumo de oxígeno relativo de células de <i>E. coli</i> MDS42 expresando o no (gris) las variantes del prionoide RepA-WH1(A31V) (rojo) y RepA-WH1(ΔN37) (amarillo) a tiempos 0, 30 min; 1, 2,5 y 4 h post-inducción	88
Figura 27: Media del nivel medio relativo de ATP en células de <i>E. coli</i> MDS42 expresando o no (gris) los mutantes A31V (rojo) y ΔN37 (amarillo) del prionoide RepA-WH1 a tiempos 0, 30 min; 1; 2,5 y 4 h post-inducción.....	89
Figura 28: Valoración mediante la incorporación de gentamicina de la integridad de la membrana celular	90
Figura 29: Halos de inhibición del crecimiento en presencia de 0,001% H ₂ O ₂ , en ausencia y presencia de ascorbato (A) , o 0,0025% paraquat (O ₂ ⁻) (B) de células de <i>E. coli</i> MDS42 expresando las variantes A31V o ΔN37 del prionoide RepA-WH1 o la proteína mRFP como control.....	91
Figura 30: Halos de inhibición del crecimiento en presencia de 0,001-0,5% H ₂ O ₂ de células de <i>E. coli</i> SLC22 (Δ <i>ndh</i>) expresando las variantes A31V o ΔN37 del prionoide RepA-WH1 o la proteína mRFP como control	92
Figura 31: Células de <i>E. coli</i> MDS42 expresando o no las variantes RepA-WH1(A31V) o WH1(ΔN37) en combinación con el sensor de H ₂ O ₂ , Hyper-3.	93
Figura 32: Media de la concentración de Fe ²⁺ extra e intracelular, de células de <i>E. coli</i> MDS42 expresando o no las variantes A31V o ΔN37 del prionoide RepA-WH1.....	95
Figura 33: Diseño de un sistema de cribado de la amiloidosis en <i>E. coli</i> basado en la agregación de RF1.....	99
Figura 34: Complementación del crecimiento por parte de las quimeras WH1(Rn)-RF1 en ausencia de RF1 celular	100

Figura 35: La expresión de las quimeras WH1(R2-4)-RF1 resulta en la lectura corrida de un codón de terminación UAG prematuro	102
Figura 36: Niveles de actividad β -galactosidasa expresados en unidades de Miller a las 3h y 6h post-inducción de las quimeras WH1(R0-4)-RF1 y los genes reporteros <i>lacZ</i> -WT y ámbar. Cinética de actividad β -galactosidasa de la quimera WH1(R2)-RF1 en combinación con el reportero <i>lacZ</i> -WT	104
Figura 37: Análisis bioquímico de la expresión de las quimeras WH1(Rn)-RF1	105
Figura 38: Ensayo <i>in vivo</i> , sobre células de <i>E. coli</i> MRA8 Δ <i>lacZ</i> , de la acción de inhibidores conocidos de la amiloidosis.	106
Figura 39: Ensayo de inhibidores polifenólicos de amiloidosis. Controles <i>lacZ</i> -WT.....	108
Figura 40: El tratamiento con resveratrol solubiliza <i>in vivo</i> los oligómeros WH1(R2-4)-RF1.....	110
Figura 41: Modelo de toxicidad propuesto para el prionoide RepA-WH1(A31V)	125
Figura 42: Contexto genético de los genes reporteros <i>lacZ</i> -WT/ámbar.....	134

Abreviaturas*

Ac	Anticuerpo
ACN	Acetonitrilo
AGE	Electroforesis en gel de agarosa
APP	Proteína precursora amiloide
Ap ^R	Ampicilina (Ap) resistente
BTA-1	2-(4'-Metilaminofenil)benzotiazol
CAA	Casaminoácidos
Cm ^R	Cloranfenicol (Cm) resistente
CPEB	Proteína de unión al elemento de poliadenilación
CTAB	Bromuro de cetil-trimetilamonio
DC	Dicroísmo circular
DIC	Contraste interferométrico diferencial
D.O	Densidad óptica
E3G	Epigalocatequina-3-galato
<i>Fitness</i>	Eficacia biológica
Gm	Gentamicina
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazina-etanosulfónico
His6	Etiqueta de 6 Histidinas
HSR	Respuesta a choque térmico (<i>Heat Shock Response</i>)
IBs	Cuerpos de inclusión (<i>Inclusion Bodies</i>)
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactósido
Kpb	Kilo par de bases
Km ^R	Kanamicina (Km) resistente
LB	Luria Bertani
MET	Microscopía electrónica de transmisión
ONPG	o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido
OPR	Repeticiones oligopeptídicas
pb	Par de bases
PrP	Proteína priónica
PSM	<i>Peptide spectrum match</i>
RBS	Sitio de unión al ribosoma
RF	Factor de terminación de la traducción
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDD-AGE	AGE en condiciones semidesnaturalizantes
SOD	Superóxido dismutasa
T ^a	Temperatura
TAE	Tris/Acético/EDTA
Th-T	Tioflavina-T
Tris	Tris(hidroximetil)-aminometano
ts	Termosensible
TSE	Encefalopatía espongiforme transmisible
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas (<i>Unfolding protein response</i>)
WH	<i>Winged-helix</i>

* Se incluyen únicamente aquellas abreviaturas no aceptadas en la página web del *Journal of Biological Chemistry* (<http://www.jbc.org/site/misc/abbrev.xhtml>)

I. SUMMARY

Development of new tools for the detection and inhibition of the amyloidosis caused in *Escherichia coli* by the RepA-WH1 prionoid and characterization of its toxicity

Introduction

The correct biological function of cells depends on the proper folding of thousands of proteins. Amyloid proteinopathies are neurodegenerative and systemic diseases that share a common etiology: the accumulation of insoluble aggregates of a particular protein, either misfolded or post-translationally processed, which are made of crossed β -sheet assemblies, the signature 3D structure of amyloids. In the crossed- β structure, multiple copies of a peptide sequence, each provided by a different molecule of the same protein, assemble as strands in β -sheets of indefinite extension which then stack and twist as fibres (Chiti & Dobson, 2006).

Amyloid aggregates are able to replicate by acting as templates for the structural transformation of other soluble molecules of the same protein into the aggregated state. This propagate the amyloid conformation among cells and tissues as a self-replicative macromolecular assembly. However, amyloids are not always related to disease. The aggregated amyloid states of a number of proteins have been reported to have physiological roles, including CsgA-curlin (which holds bacterial biofilms), Pmel17 (a scaffolding protein for enzymes involved in melanin synthesis in vertebrates), CPEB (involved in memory storage in the mollusk *Aplysia. sp*) and yeast prions, among others (Otzen & Nielsen, 2008).

In terms of toxicity, oligomers of an amyloidogenic protein, in their process toward assembling as fibres, seem to be the most toxic species. These oligomers act either directly by targeting membranes, or by depleting essential cell factors through coaggregation, or indirectly by contributing to generate reactive oxygen species (ROS) (Chiti & Dobson, 2006). Their involvement in a number of serious, often fatal, diseases such as Parkinson, Alzheimer or prion disorders among others, has positioned amyloid biology as a hot spot in protein science research, currently focused on the search for small molecules that could inhibit amyloidogenesis. To do so, apart from studies carried out in human cell cultures and mice, which have uncovered many pathways possibly linked to disease, simpler model systems that provide further insights into the essentials of the process are needed. These include *Drosophila* and *Caenorhabditis* animal models and, among microorganisms, yeast (Narayan *et al.*, 2014). Fungal prions have been crucial to unravel the molecular basis of amyloid assembly and propagation, but they are not

optimal models for disease related studies due to their nature as epigenetic determinants that confer beneficial phenotypes to their carriers. The unsurpassed potential of *Escherichia coli* as a model system in Biology have also been exploited to study the heterologous aggregation of amyloidogenic proteins, such as the *Saccharomyces cerevisiae* prion Sup35p or the Alzheimer A β peptides, which aggregate as intracellular inclusion bodies (IBs).

In our group, we work with the RepA protein, encoded within the replicon module of the *Pseudomonas* plasmid pPS10 (Nieto *et al.*, 1992). As a dimer, RepA binds to an inversely repeated operator DNA sequence to repress its own transcription (García de Viedma *et al.*, 1995). Upon binding to directly repeated DNA sequences found at the plasmid replication origin, RepA dissociates into monomers to initiate DNA replication (Giraldo, 2003; Díaz-López *et al.*, 2003, 2006). RepA is made of two winged-helix (WH) domains (Giraldo *et al.*, 1998): the N-terminal domain (RepA-WH1) acts as a dimerization module, whereas the C-terminal domain (RepA-WH2) is the main DNA binding interface (Giraldo & Fernández-Tresguerres, 2004). Similarly to the mammalian prion protein PrP and α -synuclein (involved in the aggregates found in Parkinson's disease), the RepA-WH1 domain undergoes a large α -helix to β -sheet conformational transition upon sequence-specific binding to double-stranded (ds) DNA (Giraldo, 2003; Díaz-López *et al.*, 2003, 2006). According to predictions made *in silico*, a peptide of RepA-WH1 (L₂₆VLC AASLID₃₄) has exhibited a high potential to aggregate as β -strands. The score for the aggregation prediction was higher in a single point mutant in this sequence (A31V), which was recurrently isolated in blind genetic searches for RepA variants with more efficient plasmid replication activity (Fernández-Tresguerres *et al.*, 1995; Maestro *et al.*, 2003). A synthetic peptide containing this sequence assembles into fibres, visualized by TEM. These fibres also exhibit the characteristic amyloid pattern showed by X-ray diffraction (Giraldo, 2007). Not only this peptide but also the whole RepA-WH1(A31V) domain assembles into amyloid fibres *in vitro* (Giraldo, 2007) whose structure have recently been solved by TEM (Torreira *et al.*, 2015). Furthermore, fusions of RepA-WH1(A31V) to a fluorescence protein tag allow us to follow the aggregation of the protein in the *E.coli* cytoplasm, revealing a drastic reduction in cell proliferation upon formation of aggregates (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2010). Those inclusions, purified from cell extracts, also enable conformational templating of soluble RepA-WH1(A31V) *in vitro*. In addition to this toxicity, RepA-WH1(A31V) aggregates differ from conventional IBs in their higher affinity for the amyloidotropic fluorophore BTA-1 and in exhibiting dynamic interconversion between two distinct amyloid species, which resemble prion strains. We have also shown

that the latter process is modulated by DnaK (the *E.coli* Hsp70 chaperone) that generates oligomeric RepA-WH1 particles, which are readily transferred to the progeny during bacterial cell division (Gasset-Rosa *et al.*, 2014). Being vertically transmissible from mother to daughter cells, but not infectious, RepA-WH1 qualifies as the first entirely bacterial prionoid.

Objectives & Results

Considering the precedents described above, the objectives of this thesis were:

1. To explore the *in vivo* ability of different variants of the RepA-WH1 prionoid to cross-seed their aggregation in *Escherichia coli*.
2. To identify and characterize the cellular pathways involved in the toxicity produced by the RepA-WH1(A31V) prionoid in *E. coli*.
3. To develop an *in vivo* screening system based on chimeras between repeats of the amyloidogenic sequence in WH1 and the *E. coli* translation terminator factor RF1, for identification of protein sequences with amyloid potential and its validation through compounds that inhibits the amyloidogenic process.

1. The co-aggregation ability of RepA-WH1 variants was studied *in vivo* by means of pairwise coexpression of *repA-WH1* alleles coding for protein variants with diverse amyloidogenic properties: the hyperamyloidogenic variant A31V, which aggregates as multiple globular foci, the mildly amyloidogenic WT variant, which remains soluble in the *E. coli* cytoplasm, and the Δ N37 variant, which lacks the amyloidogenic N-terminal stretch of RepA and aggregates as conventional mono or bipolar IBs (Giraldo *et al.*, 1998; Gasset-Rosa *et al.*, 2014). All these three variants were tracked via epitope tags and fusions to different colored fluorescent proteins to address how they mutually influence their aggregation *in vivo*. We found that the interplay between their intrinsic aggregation tendencies, expression levels and intermolecular contacts determines the solubility vs. aggregation balance for each RepA-WH1 variant. Diffused fluorescence was only observed in cells simultaneously expressing the WT variants fused to both fluorescent tags (Figure 19A). However, both aggregation-prone variants, A31V and Δ N37, dominated over the WT, which became aggregated following the pattern of its coexpressed partner (Figure 19A). The amount of protein present in the soluble or aggregated fraction of cell lysates was analysed by Western-blot confirming the same results (Figure 19B) (Molina-García & Giraldo, 2014).

2. The pathways of amyloid toxicity of RepA-WH1 were studied combining transcriptomic, proteomic and physiological approaches. We have analyzed through

microarrays the gene expression pattern of cells expressing RepA-WH1 and through mass spectrometry the fraction of the *E. coli* proteome co-aggregated with RepA-WH1 amyloid inclusions. Combining both types of approaches, we identified 47 potential cellular targets grouped in 32 functional clusters, comprising 5 fundamental biological processes that we also validated by studying membrane integrity, oxygen consumption rates, iron and ATP levels and sensitivity to oxygen reactive species (ROS). All of these parameters were lower in cells expressing the hyperamyloidogenic variant A31V (Figures 26-28), except for sensitivity to ROS which was higher due to the increase in the expression levels of Ndh-II dehydrogenase in that mutant (Figures 29-31). Our results indicate that cell damage is produced by a ROS-dependent mechanism, most likely involving Fenton chemistry. These findings support a role for free iron in amyloid cyto-toxicity, possibly due to membrane damage by amyloid oligomers as has been proposed for the general cyto-toxicity in human proteinopathies induced by distinct amyloids.

3. The design of the **WH1(Rn)-RF1 chimeras screening system** was based on the molecular basis of the yeast prion Sup35p [*PSI*⁺]. Sup35p is the translation release factor 3 in eukaryotes (eRF3) and drives the final stage of polypeptide synthesis after stop codon recognition by its partner Sup45p (eRF1). In normal situations (non prion phenotype, [*psi*⁻]), Sup35p is soluble and functional. However, when it aggregates (prion phenotype, [*PSI*⁺]) the reduced levels of the soluble factor make it unable to finish translation efficiently, promoting stop codon readthrough and the generation of longer polypeptides (Figure 9; Tessier & Lindquist 2009). This feature has enabled the development of a widely used amyloid aggregation reporter system, in which a premature stop codon, placed in one of the genes involved in the adenine biosynthetic pathway, acts as a sensor of Sup35p aggregation: when the protein remains soluble, it finishes the translation at the premature stop codon and the previous metabolite in the pathway is accumulated, causing a red coloration in the yeast cells. On the contrary, when Sup35p is aggregated, it ignores the premature stop codon and ribosomes complete the synthesis of the whole protein making the cells exhibit their natural white coloration. Previous work of our laboratory had shown that the substitution of the amyloid repeats present in Sup35p with tandem repeats of the amyloidogenic peptide of RepA-WH1 allowed the recovery of the prion phenotype (Gasset-Rosa & Giraldo, 2015). Based on all of these precedents, we have developed here a system in which the aggregation of the bacterial translation release factor 1 (RF1), promoted by its fusion to the same repeats of the RepA-WH1 amyloid peptide that were functional in yeast, produces the readthrough of a premature stop codon placed in a *lacZ* reporter gene. We found that as the readthrough

takes place, *E. coli* cells exhibit blue coloration in presence of X-Gal, a phenotype that is dependent on having 2 or more fused repeats to RF1 (Figure 35). According to this, our results also showed an increased in β -galactosidase activity and the presence of high molecular weight SDS-resistant amyloid oligomers dependent on the inclusion of 2 or more WH1 repeats in the chimeras (Figure 37). Moreover, the treatment with resveratrol, a polyphenol described *in vitro* as an inhibitor of amyloidogenesis, reverts both the coloration and aggregation phenotypes, indicating its effect as an inhibitory compound or as a modulator of the amyloid aggregation *in vivo* (Figure 40). Thus, the system developed in this Thesis not only monitors the amyloid potential of a protein sequence but it is also useful to screen for inhibitory compounds of the amyloidogenesis.

Conclusions

1.1. The hyperamyloidogenic RepA-WH1(A31V) variant induces cross-aggregation in the cytoplasm of *E. coli*, enhancing the growth of amyloid particles by a different variant of the same protein with reduced amyloidogenicity.

1.2. The colocalization assay performed in this Thesis easily discriminates *bona fide* amyloid aggregation from formation of IBs.

2.1. The expression of different variants of RepA-WH1 prionoid, A31V or Δ N37, induces a different gene expression pattern in *E. coli* cells that allowed us to identify the cellular response specifically due to amyloid aggregation. Both proteins variants also sequester different cellular factors that coaggregate with them.

2.2. The initial event in the cyto-toxicity cascade of RepA-WH1 prionoid seems to be membrane damage.

2.3. The cellular toxicity of RepA-WH1 prionoid is produced by a ROS-dependent mechanism, most likely involving Fenton chemistry.

3.1. The screening system based on WH1(R_n)-RF1 chimeras developed in this Thesis is useful to identify protein sequences with amyloidogenic potential *in vivo*.

3.2. The amyloid aggregation of the WH1(R_n)-RF1 chimeras depends on having two or more repeats of the RepA-WH1(A31V) amyloidogenic peptide.

3.3. Resveratrol treatment reverse the colored and aggregated phenotype of the WH1(R_n)-RF1 prionoids, provided they carry 2 or more repeats of the WH1(A31V) amyloidogenic peptide. Thus, the WH1(R_n)-RF1 chimeras are useful to monitor the activity of potential inhibitors of amyloidosis.

3.4. The chimeric WH1(R_n)-RF1 screening system is the first designed to monitor the amyloidogenic potential of peptide sequences based on biotechnological manipulation of the bacterial translation process.

II. INTRODUCCIÓN

1. Bases moleculares y estructurales de la agregación amiloide

1.1. Estructura de amiloides

El auge creciente del interés por el estudio de la agregación de proteínas reside principalmente en su implicación como agente causal del conjunto de enfermedades degenerativas conocidas como amiloidosis, sistémicas o neurológicas (Corea de Huntington, Parkinson, Alzheimer o las enfermedades producidas por priones), asociadas con la aparición de agregados fibrilares de distintas proteínas (Chiti y Dobson, 2006). El evento fundamental que subyace a todos estos trastornos es la agregación de proteínas anormalmente plegadas en polímeros fibrilares amiloides.

Las fibras amiloides se caracterizan por presentar una estructura conocida como “lámina- β cruzada”, formada por múltiples copias de un segmento peptídico, procedentes de diferentes moléculas de la misma proteína, que se ensamblan formando hebras- β . Éstas interactúan disponiéndose perpendicularmente al eje de la fibra constituyendo así una lámina- β de extensión indefinida, cuya yuxtaposición y trenzado dará lugar a la formación de fibras amiloides (Figura 1) (Chiti y Dobson, 2006). La interacción entre las hebras- β adyacentes (espaciadas por $\sim 4,7$ Å) está mediada por puentes de hidrógeno y la compatibilidad de las cadenas laterales de los residuos implicados determina su disposición, paralela o antiparalela, en la lámina- β . El empaquetamiento de láminas contiguas (espaciadas $\sim 9-11$ Å) sucede a través de la interdigitación de las cadenas laterales compatibles (hidrofóbicas o polares) dando así lugar a una estructura denominada “cremallera estérica” (Nelson y col., 2005; Perutz y col., 1993; Sawaya y col., 2007). Las fibras amiloides se caracterizan por presentar una elevada estabilidad a cambios físicos y químicos, siendo el estado amiloide el más estable, en términos termodinámicos que puede adoptar una cadena polipeptídica (Baldwin y col., 2011).

A pesar de que todas las proteínas amiloides presentan la estructura común en lámina- β cruzada, los detalles precisos del ensamblaje de los monómeros, así como de las hebras y láminas- β , para su incorporación en la estructura fibrilar, puede diferir enormemente entre distintos amiloides e incluso dar lugar a variantes fenotípicas para una misma proteína (Toyama y Weissman, 2011). En general, las láminas- β pueden disponerse de manera paralela o antiparalela formando arcos- β (topología hebra- β -bucle-hebra- β), en los que cada hebra está rotada aproximadamente 90° , permitiendo así que la interacción entre hebras se de a través de las cadenas laterales de los residuos que las componen y no

del esqueleto peptídico, que queda así disponible para establecer puentes de hidrógeno entre las hebras dispuestas perpendicularmente al eje de la fibra (Kajava y col., 2010). Entre los ejemplos de este tipo de ensamblajes destacan el péptido A β (Antzutkin y col., 2002) y los priones de levadura Sup35p (Shewmaker y col., 2006), Ure2p (Chan y col., 2005) y Rnq1p (Wickner y col., 2008).

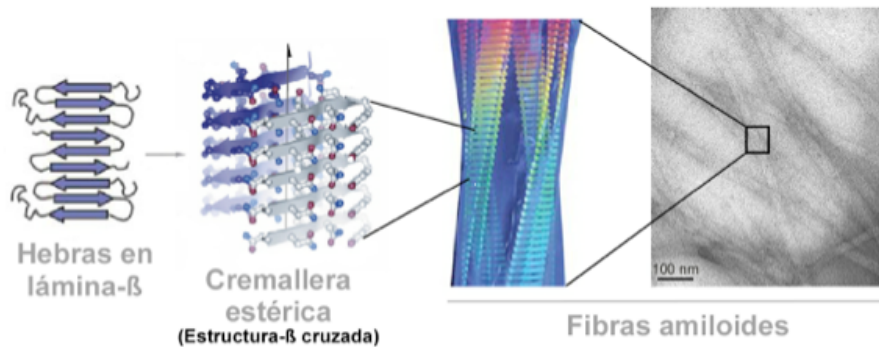


Figura1: Estructura genérica de las fibras amiloides. Distintas hebras- β interactúan formando una lámina- β , cuya interacción con láminas- β adyacentes genera una cremallera estérica. La yuxtaposición y trenzado de estas últimas dará lugar a fibras amiloides ordenadas

En las cremalleras estéricas, el empaquetamiento puede ser, además, frontal-frontal, dorsal-dorsal o fronto-dorsal implicando tanto láminas- β paralelas como antiparalelas (Eisenberg y Jucker, 2012).

La estructura de los distintos ensamblajes amiloides varía, asimismo, en el número y la disposición de las protofibras que componen las fibras pudiendo distinguirse topológicamente tres tipos de ensamblajes: i) apilamiento axial de arcos- β , que genera una doble capa de láminas- β paralelas en registro; ii) estructuras- β paralelas apiladas, en las que cada cadena polipeptídica contiene varios arcos- β conectados que se disponen así en zigzag en un plano; y iii) solenoides en los que dos o más arcos- β aportados por cada monómero de proteína se disponen en forma helicoidal (Figura 2).

La estructura tridimensional (3D) de varios ensamblajes amiloides formados por péptidos de pequeño tamaño ha sido resuelta mediante cristalografía de rayos X (Ivanova y col., 2009; Liu y col., 2011; Nelson y col., 2005), o mediante resonancia magnética nuclear en estado sólido (ssNMR) (Fitzpatrick y col., 2013), mientras que las estructuras de ensamblajes fibrilares completos se han resuelto, en general con menor resolución, utilizando microscopía electrónica sobre partículas únicas combinada con métodos de reconstrucción de imagen (Mizuno y col., 2011; Torreira y col., 2015).

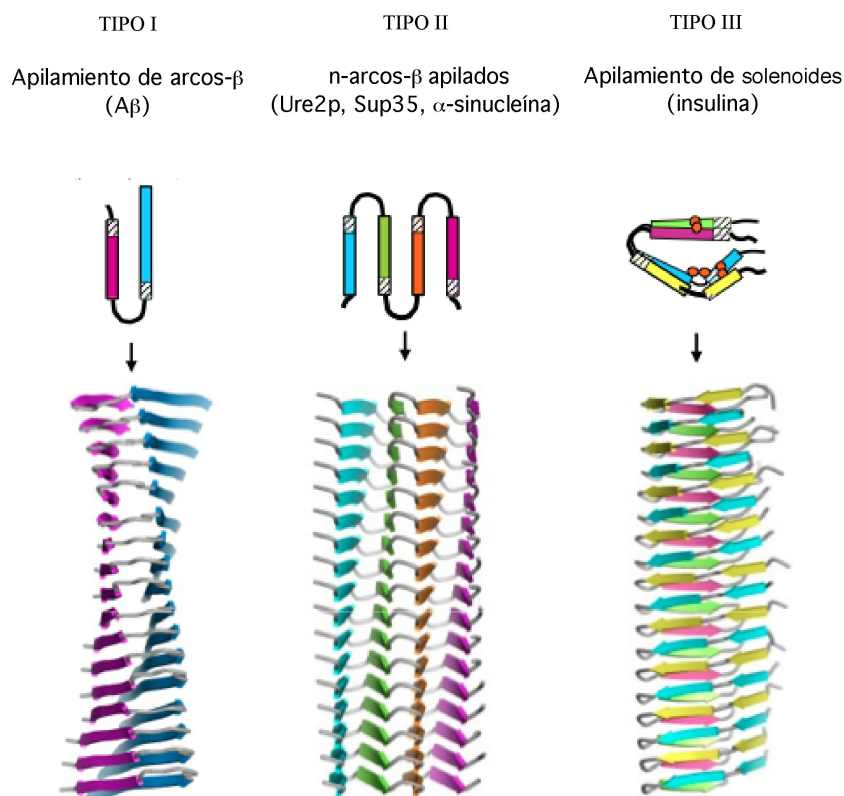


Figura 2: Tres tipos de modelos de cruce-β en protofibras amiloides. (Arriba) vista axial de las unidades estructurales repetitivas, los rectángulos representan hebras-β. (Abajo) Vista lateral de las protofibras formadas por el apilamiento axial de las distintas unidades repetitivas. Modificado de Kajava y col., 2010.

Cuando las fibras están constituidas por moléculas completas de proteína, como ocurre en el caso de la insulina (Ivanova y col., 2009), β2-microglobulina (Liu y col., 2011) y SOD-1 (Elam y col., 2003), en las que la proteína completa presenta un plegamiento 3D estable, una cuestión relevante es si dicha proteína sufre un cambio conformacional drástico o simplemente expone, parcial y temporalmente, residuos capaces de mediar su ensamblaje amiloide. Ejemplos del primer caso lo constituyen las fibras de insulina (Ivanova y col., 2009) y β2-microglobulina (Liu y col., 2011), mientras que SOD-1 es representativa del segundo (Elam y col., 2003). Sin embargo, a excepción del prion HET-s, se carece de estructuras 3D de amiloides a resolución propiamente atómica de cualquier otra proteína completa en su estado amiloide fibrilar.

1.2. Polimorfismo estructural en amiloides: variantes y estirpes

Una de las características más importantes de las fibras amiloides es su propensión al cambio conformacional, lo que da origen a polimorfismos (Krishnan y Lindquist, 2005; Paravastu y col., 2008; Wiltzius y col., 2009). Los péptidos amiloidogénicos son capaces de formar fibras con distinta morfología lo que refleja diferencias en los contactos entre sus

moléculas constituyentes (Goldsbury y col., 1997; Petkova y col., 2005). El polimorfismo amiloide tiene otra de sus fuentes en la presencia de las propias cremalleras estéricas (Wiltzius y col., 2009) que dan lugar a diferencias de empaquetamiento o segmentales, cuando las hebras- β proceden del mismo o de distintos segmentos de la proteína, respectivamente. En general, las proteínas amiloides suelen tener más de un segmento capaz de dar lugar a una cremallera estérica (Wiltzius y col., 2009), como ocurre en las fibras formadas por proteínas que contienen repeticiones amiloidogénicas imperfectas en tándem de una secuencia consenso dada (Pawar y col., 2005), lo que puede generar ensamblajes no en registro que pueden dar lugar a la aparición de múltiples agregados alternativos, que originan distintas estirpes o variantes con fenotipos diferenciados del estado amiloide (Tycko, 2006).

1.3. Propagación: Transformación del estado nativo al estado amiloide

La polimerización de amiloides se basa en la formación de un núcleo inicial de una proteína mal plegada, que actuará a su vez como molde para promover la transición de las formas solubles normales de la misma hacia la forma ensamblada en lámina β -cruzada (Eichner y Radford, 2011a; Harper y Lansbury, 1997), lo que se conoce como transmisibilidad molecular.

El ensamblaje amiloide requiere, en general, un desplegamiento parcial de la proteína con el fin de exponer residuos con potencial amiloidogénico, no accesibles al solvente al encontrarse formando parte de hélices- α o localizados en el interior del núcleo de la proteína plegada (Giraldo, 2010). Existen distintos factores capaces de mediar dicho desplegamiento *in vitro*: pH ácido, presiones y temperaturas elevadas, o soluciones concentradas de agentes desnaturalizantes y caotrópicos (guanidina y urea). Dada su agresividad, estas condiciones son difícilmente aplicables en ensayos que mimeticen los procesos de amiloidosis *in vivo*. Sin embargo, los ligandos alostéricos suponen una alternativa específica para modular la estructura proteica con alta afinidad y amplio rango dinámico (Laskowski y col., 2009), alterando el equilibrio conformacional de las proteínas a varios niveles: disociando las subunidades en un oligómero, alterando localmente la estructura terciaria o mediando una conversión entre estructuras secundarias (desplegamiento de hélices- α generando una estructura desordenada que actúe de núcleo amiloide). Así, la unión de un ligando podría inducir la formación de un conjunto de

intermediarios metaestables de la proteína (N^*) (Figura 3), algunos de los cuales serán capaces de actuar como núcleos de amiloidogénesis (Giraldo, 2010).

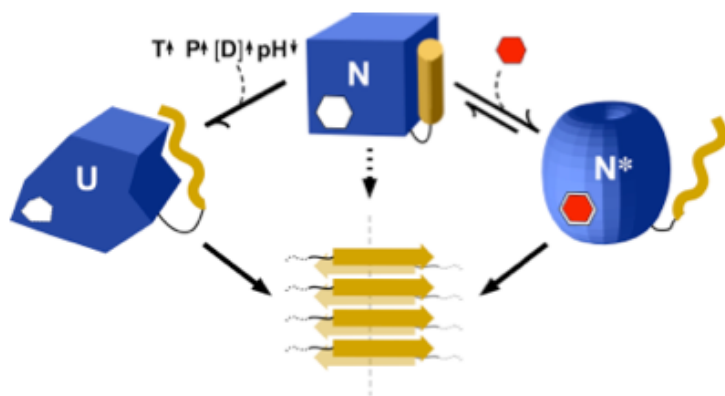


Figura 3: Mecanismos de inducción del estado amiloide. El desplegamiento parcial de las proteínas requerido para su ensamblaje amiloide puede producirse alterando las condiciones físico-químicas del medio (T^a , P y pH) o mediante la unión de ligandos alostéricos que específicamente alteran la conformación de la proteína generando un intermediario metaestable (N^*) con tendencia a agregar. Imagen tomada de Giraldo, 2010.

Según modelos experimentales basados en medidas espectroscópicas, la cinética del ensamblaje amiloide se ajusta a una curva sigmoideal (Andersen y col., 2009; Frieden, 2007) en la que se distinguen 2 fases: Una fase inicial lenta (fase de latencia) en la que se produce la nucleación, es decir, la conversión conformacional de la proteína nativa, que conlleva la formación de pequeños oligómeros, y otra fase rápida de elongación (parte exponencial de la curva) en la que se añaden sucesivamente nuevos oligómeros a los agregados preformados. La pendiente de la curva, que indica la rapidez (cooperatividad) de esta última fase, depende de la capacidad de conversión de los núcleos, de la tasa de deposición de la proteína soluble en los extremos de la fibra y del número de éstos generados por fragmentación. (Figura 4).

Por lo que respecta al mecanismo de propagación *in vivo*, se sabe que ciertos factores celulares son moduladores esenciales de la conversión hacia la forma amiloide y/o de la propagación de la misma (Chernoff y col., 1995). Concretamente, en el caso de los priones de levadura, estudios genéticos han demostrado la implicación de la chaperona Hsp104 en la propagación de los mismos (Tuite y Cox, 2003), fragmentando las fibras amiloides en un proceso dependiente de hidrólisis de ATP. Así, se generan nuevos propagones (Kushnirov y Ter-Avanesyan, 1998) cuya presencia acelera la conversión de la forma soluble a la forma priónica de la proteína en el interior de la célula.

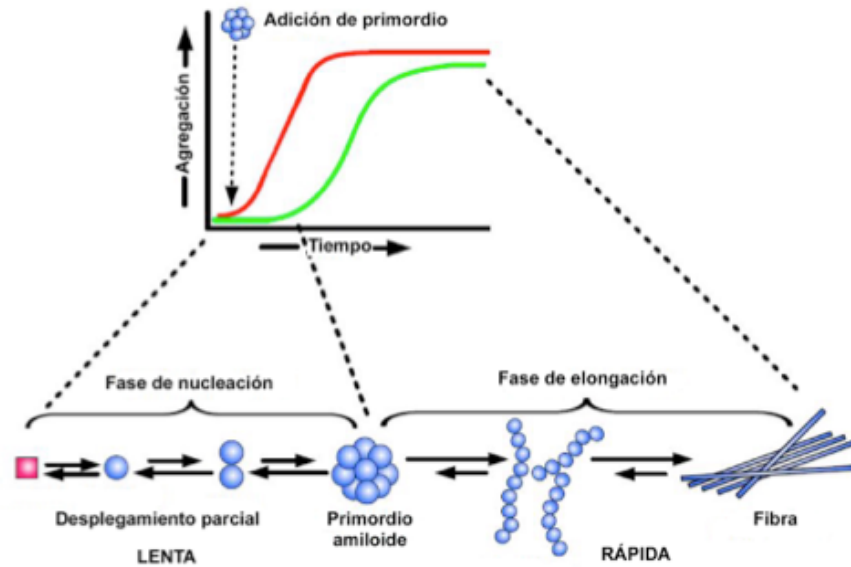


Figura 4: Cinética de la agregación amiloide. Durante la fase lenta de nucleación, se produce un desplegamiento parcial de la proteína. La interacción entre distintas moléculas parcialmente desplegadas generará un primordio amiloide que actuará como núcleo de agregación. Durante la fase de elongación (rápida) el depósito de nuevas moléculas de proteína sobre el primordio amiloide producirá la formación de fibras amiloides estructuradas. El tiempo de la fase de nucleación puede acortarse añadiendo al medio primordios amiloides preformados y la elongación acelerarse mediante la generación de nuevos extremos de crecimiento mediante la fragmentación de las fibras. Imagen tomada de Gasset-Rosa, 2012 (Tesis Doctoral).

2. Biología del estado amiloide: amiloides funcionales y amiloidosis

2.1. Priones y prionoides

Como se ha descrito en el apartado 1.1, entre las amiloidosis, producidas por la acumulación y depósito de proteínas que se ensamblan formando agregados amiloides, se encuentran las enfermedades producidas por priones (Chiti y Dobson, 2006).

En 1982 Stanley Prusiner acuñó el término de prion, definiéndolo como un agente proteico infeccioso resistente a la inactivación por la mayoría de procesos que modifican ácidos nucleicos, tras aislar la forma agregada de la proteína PrP responsable de las llamadas encefalopatías espongiformes transmisibles (TSEs) (Prusiner, 1982). Los priones constituyen, por tanto, formas autoreplicativas de proteína que son capaces de propagarse no sólo entre la progenie de una línea celular (transmisión vertical), sino también horizontalmente, entre distintos organismos, lo que les confiere su infectividad (Ma y Lindquist, 2002; Prusiner, 1998).

Además de estar presentes en mamíferos, posteriormente se describió la existencia de priones en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Podospora anserina*) (Coustou y col.,

1997; Wickner, 1994), lo que, junto con el desarrollo de modelos animales transgénicos (Weissmann y col., 1999) y ensayos de conversión priónica *in vitro* (Caughey, 2003), ha permitido avanzar en el estudio del mecanismo de conversión y propagación de este tipo de agentes (Wickner y col., 2007) (Tessier y Lindquist, 2009).

Además de los priones, existen muchas otras proteínas (α -sinucleína, péptido A β , Tau, Hungtintina, SOD-1) capaces de adquirir una estructura en lámina- β cruzada y de autorreplicarla nucleando dicha conformación sobre la forma soluble de esas mismas proteínas, dando lugar a depósitos amiloides. Los agregados de estas proteínas, denominadas prionoides, pueden ser transmitidos verticalmente pero carecen de infectividad (Aguzzi, 2009).

2.2. Amiloides funcionales

Además de las proteínas amiloides implicadas en el desarrollo de enfermedades existen amiloides funcionales ampliamente distribuidos en la naturaleza (metazoos, hongos y bacterias) cuya presencia resulta ventajosa para desarrollar adaptaciones rápidas al medio en los organismos que los heredan, comportándose como elementos epigenéticos alternativos al ADN. De esta manera los ensamblajes amiloides constituyen, junto con la metilación del ADN y la heterocromatización de regiones del genoma, un tercer mecanismo epigenético basado en proteínas agregadas que se heredan citoplasmáticamente sin ceñirse a las leyes de Mendel (Halfmann y Lindquist, 2010).

Entre los amiloides funcionales en metazoos, cabe destacar el fragmento proteolítico de la glicoproteína de membrana Pmel17 (Figura 5) que se ensambla contribuyendo a la maduración del melanosoma y promoviendo la síntesis de melanina (Fowler y col., 2006). Otro ejemplo, lo constituye la isoforma neuronal de la proteína de unión al elemento de poliadenilación citoplasmática (CPEB) que, gracias a su dominio N-terminal rico en repeticiones de glutamina, se ensambla como amiloide en las neuronas postsinápticas formando complejos CPEB/ARN (Si y col., 2010); (Raveendra y col., 2013) que contribuyen al almacenamiento de la memoria en el molusco *Aplysia* (Kandel, 2012).

En bacterias existen distintos ejemplos de amiloides funcionales, todos ellos ensamblados en el medio extracelular. El más conocido es el caso de las fibras de curlina, con alto contenido en estructura β -laminar, empleadas por las enterobacterias (*Escherichia* y *Salmonella*) para formar biopelículas y colonizar nuevos medios (Figura 5). El *curli* de *E. coli* está formado por al menos 6 proteínas codificadas en dos operones

divergentes (csgAB y csgDEFG) cuya expresión es sensible a variaciones ambientales (Gerstel y Romling, 2003) y parece estar mediada por RpoS, el factor sigma de la fase estacionaria (Arnqvist y col., 1994). CsgA y CsgB intervienen activamente en el ensamblaje del curli, siendo el mismo, resultado de un proceso de complementación que tiene lugar en el medio extracelular. Por su parte CsgDEFG son proteínas accesorias requeridas en el proceso de ensamblaje (Hammar y col., 1995). *Streptomyces coelicolor* produce una hifa aérea para dispersar sus esporas que está recubierta por chaplinas, proteínas con superficie hidrofóbica amiloide (Epstein y Chapman, 2008). *Klebsiella pneumoniae* produce la microcina E492, un péptido pequeño citotóxico con características amiloides (Arranz y col., 2012), que utiliza para generar poros en las membranas citoplasmáticas de otras bacterias (Destoumieux-Garzon y col., 2003). *Bacillus subtilis* utiliza la proteína amiloide TasA para dotar de integridad estructural a la matriz extracelular necesaria para su crecimiento en forma de biopelícula (Branda y col., 2006; Branda y col., 2001; Romero y col., 2010). Existen también amiloides funcionales secretados por bacterias fitopatógenas, las harpinas. Éstas se ensamblan como amiloides atacando las membranas y produciendo la muerte de las células de la planta (Oh y col., 2007).

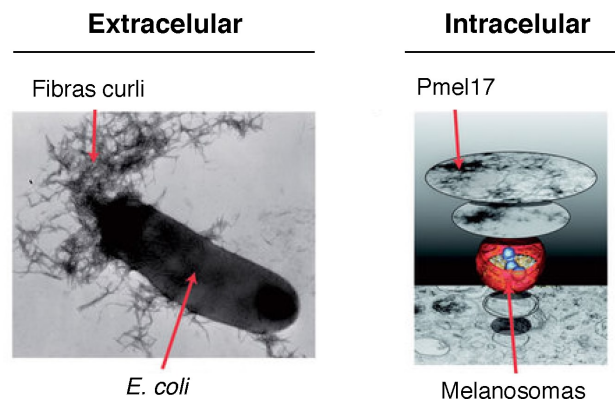


Figura 5: Ejemplos de amiloides funcionales. Las fibras de curlina secretadas al medio por *E. coli* constituyen la matriz de biopelículas para colonizar nuevos nichos. Los agregados intracelulares de Pmel17 contribuyen a la maduración de los melanosomas y promueven la síntesis de melanina.

En el caso de las levaduras, existen decenas de priones descritos que confieren ventaja selectiva ante distintas condiciones ambientales sin ser deletéreos para las células (Wickner y col., 2007). Los más estudiados son los formados por las proteínas Sup35p, Ure2p, Rnq1p en *Saccharomyces cerevisiae* y HET en *Podospora Anserina*. Sup35p es el factor de terminación de la traducción (eRF3) de eucariotas. Su conversión al estado agregado Sup35p [*PSI*⁺] reduce la actividad de terminación de la traducción (Patino y col.,

1996; Wickner y col., 1995) lo que resulta en la lectura corrida de los codones de terminación del ARN mensajero (ARNm) generando fenotipos ventajosos en algunas condiciones de estrés (Eaglestone y col., 1999; True y col., 2004). Ure2p es un inhibidor del factor transcripcional Gln3. Éste reprime genes encargados del metabolismo de compuestos pobres en nitrógeno cuando fuentes más abundantes se encuentran en el medio (Lian y col., 2006). La conversión del estado soluble de Ure2p [*ure-o*] al estado priónico [*URE3⁺*] libera la inhibición y permite la expresión génica de Gln3 (Wickner, 1994). Rnq1p, cuando se encuentra en su estado agregado [*RNQ⁺*], actúa como un efector de la nucleación de [*PSI⁺*] (Derkatch y col., 1996; Wickner y col., 2001). Por último HETs, en su estado priónico [*Het-s*], regula la incompatibilidad heterocarionte en *P. anserina* evitando la fusión de hongos con distintos genomas (Coustou y col., 1999) al facilitar la muerte celular de ciertas fusiones incompatibles.

2.3. Proteinopatías amiloides

Además de desempeñar funciones concretas en la Naturaleza, priones y prionoides son responsables de las proteinopatías amiloides (Tabla 1). Todas ellas se basan en el ensamblaje de proteínas que, al ser incapaces de adquirir su conformación nativa funcional, agregan como amiloides (Figura 6). Estos agregados se depositan en células y tejidos donde reducen la cantidad de proteína soluble capaz de ejercer su función fisiológica, secuestran por coagregación proteínas esenciales para la viabilidad celular o atacan dianas celulares concretas, desencadenándose así la patología.

Las alteraciones motoras que caracterizan a la enfermedad de Parkinson son debidas a la muerte de neuronas dopaminérgicas de la *substancia nigra*, inducida por acumulación en las mismas de depósitos amiloides de la proteína α -sinucleína denominados cuerpos de Lewi (Goedert y col., 2013; Jellinger, 2009).

La α -sinucleína es una proteína pequeña (14,5 kDa) intrínsecamente desplegada. Presenta un dominio N-terminal con repeticiones degeneradas de un péptido que median su inserción entre los fosfolípidos de la membrana (Irvine y col., 2008), un dominio central compuesto por residuos hidrofóbicos implicados en la formación de fibras amiloides (Singleton y col., 2003) y un dominio C-terminal con función chaperona que solubiliza complejos de alto peso molecular (Park y col., 2002). Además, presenta un péptido señal críptico para su exportación a la mitocondria (Butler y col., 2012; Devi y col., 2008). Así, se acumula en mitocondrias de la *substancia nigra* y el estriado donde

inhibe el complejo I de la cadena de transporte de electrones contribuyendo a la generación de estrés oxidativo, característico en enfermedades neurodegenerativas (Haelterman y col., 2014). Aunque su función es desconocida, se ha propuesto su implicación en el mantenimiento de componentes sinápticos (Murphy y col., 2000) y la regulación de la síntesis de dopamina (Pérez y col., 2002).

La α -sinucleína puede, además, actuar de manera similar a los priones: Se ha demostrado que tejido embrionario injertado en el cerebro de enfermos de Parkinson adquiere con el tiempo cuerpos de Lewi (Li y col., 2008) que se transmiten mediante exo y endocitosis (Lee y col., 2005; Lee y col., 2008), propagando así de célula a célula el estado amiloide (Aguzzi y Rajendran, 2009).

Fenotipo/Función	Proteína	Transmisibilidad molecular	Infectividad
Enfermedad priónica	PrP	Sí	Sí
Enfermedad de Alzheimer	A β	Sí	Ratones que que sobreexpresan APP
Enfermedad de Parkinson	α -sinucleína	Huésped a injerto	No demostrada
Taupatias	tau	Posible	No demostrada
Enfermedad de Huntington	poliQ	Sí	No demostrada
Supresor de terminación traduccional	Sup35p	Sí	Limitado
Producción de biopelículas	Curli /Tsa	Sí	No demostrada
Incompatibilidad de heterocariontes	Het-s	Sí	No demostrada
Pigmentación de la piel en mamíferos	Pmel17	No demostrada	No demostrada

Tabla 1: Priones y prionoides implicados en el desarrollo de amiloidosis (separados por línea gris) y amiloides funcionales. Al igual que PrP, todos ellos pueden auto-ensamblarse y replicar como amiloides, sin embargo su capacidad infectiva aún no ha sido demostrada. Tabla adaptada de Aguzzi, 2009.

La enfermedad de Alzheimer es una alteración neurodegenerativa caracterizada por la pérdida progresiva de la función cognitiva. Los cerebros de pacientes con Alzheimer presentan placas extracelulares de péptido A β (Glenner y Wong, 1986) así como fibras de la proteína Tau (Brion y col., 1986; Grundke-Iqbal y col., 1986), anormalmente fosforilada, en el interior de las neuronas (Treusch y col., 2009). La elevación de los niveles del péptido A β se debe a una desregulación en la vía proteolítica de la proteína precursora amiloide (APP): en la enfermedad de Alzheimer se da un procesamiento proteolítico

preferencial por β -secretasa que genera un péptido precursor, el cual, tras ser procesado por γ -secretasa, dará lugar al péptido A β . Finalmente los monómeros de A β (formados por 40-42 aminoácidos) se ensamblan formando agregados amiloides citotóxicos que inducen la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno, en concentraciones anormalmente elevadas, así como la depleción de antioxidantes endógenos (Mark y col., 1996).

Los depósitos amiloides de la proteína PrP, son los responsables del desarrollo de las denominadas encefalopatías espongiformes transmisibles (TSEs) o enfermedades priónicas (Chesebro, 2003; Prusiner, 1982). Estas incluyen: i) en humanos: las enfermedades de Creutzfeldt-Jakob y Gerstmann-Sträussler-Scheinker, el insomnio familiar fatal, el kuru, y la prionopatía variable sensible a proteasa (VPSPr) (Zou y col., 2010); y ii) en animales: la encefalopatía espongiforme bovina (BSE), el prurigo lumbar en (*Scrapie*) y la caquexia crónica (CWD) (Poggiolini y col., 2013). La base molecular de todas ellas reside en la conversión postraduccional de la proteína PrP celular (PrP^C), en una isoforma resistente a proteasas denominada PrP^{Sc}. Los agregados amiloides de PrP^{Sc} se depositan, extracelularmente, en el cerebro (Prusiner, 1982, 1998) produciendo inflamación, muerte celular y degeneración espongiforme. Aunque ambas isoformas presentan la misma secuencia de aminoácidos y comparten las mismas modificaciones postraduccionales, sus propiedades bioquímicas son radicalmente distintas.

PrP^C, codificada en el gen *PRNP*, es una proteína monomérica, glicosilada y enriquecida en estructura α -helicoidal (47%) (Caughey, 1991; Riek y col., 1998), siendo particularmente abundante en el sistema nervioso central (Bendheim y col., 1992). Presenta un pequeño dominio N-terminal desorganizado, un dominio central globular formado por tres hélices- α y una lámina- β antiparalela, y un apéndice corto y flexible C-terminal por el que se ancla a las membranas celulares a través de GPI (Harris, 1999). Aunque su función fisiológica no está clara, se ha descrito su implicación en la regulación de la homeostasis del Cu²⁺, en la adhesión celular y en la señalización intracelular *in vivo*, pudiendo, por tanto, modular las sinapsis (Cobb y Surewicz, 2009; Málaga-Trillo y col., 2009).

Por su parte, PrP^{Sc} es un polímero enriquecido en lámina- β (43-54%) (Caughey, 1991; Riek y col., 1998), insoluble en detergente y parcialmente resistente a proteólisis gracias a un segmento de unos 142 aminoácidos denominado PrP 27-30 (PrP^{res}), que le confiere su capacidad infecciosa (Oesch y col., 1985).

La conversión de PrP^C a PrP^{Sc} puede darse *in vivo*, con baja frecuencia, de manera espontánea; también mediante la infección con agregados preformados, o por mutaciones en el gen *PRNP*. Por ejemplo, alteraciones en el número de repeticiones de un octapéptido presente en el extremo N-terminal de PrP^C: cinco repeticiones del mismo constituyen el dominio OPR, conteniendo las versiones mutantes del gen *PRNP* de dos a nueve repeticiones extra de dicho dominio (Kovacs y col., 2002; Wadsworth y col., 2003). Además de las chaperonas (Fernández-Funez y col., 2009; Zhang y col., 2012), existen otros cofactores celulares que contribuyen *in vitro* al mecanismo de conversión: lípidos, glucosaminglicanos y polisacáridos sulfonados, (Kil y Caughey, 2007; Wong y col., 2001; Yokoyama y col., 2011) así como ADN (Cordeiro y col., 2001) o ARN (Adler y col., 2003; Weiss y col., 1997). Sin embargo las bases moleculares del mismo aún no han sido identificadas.

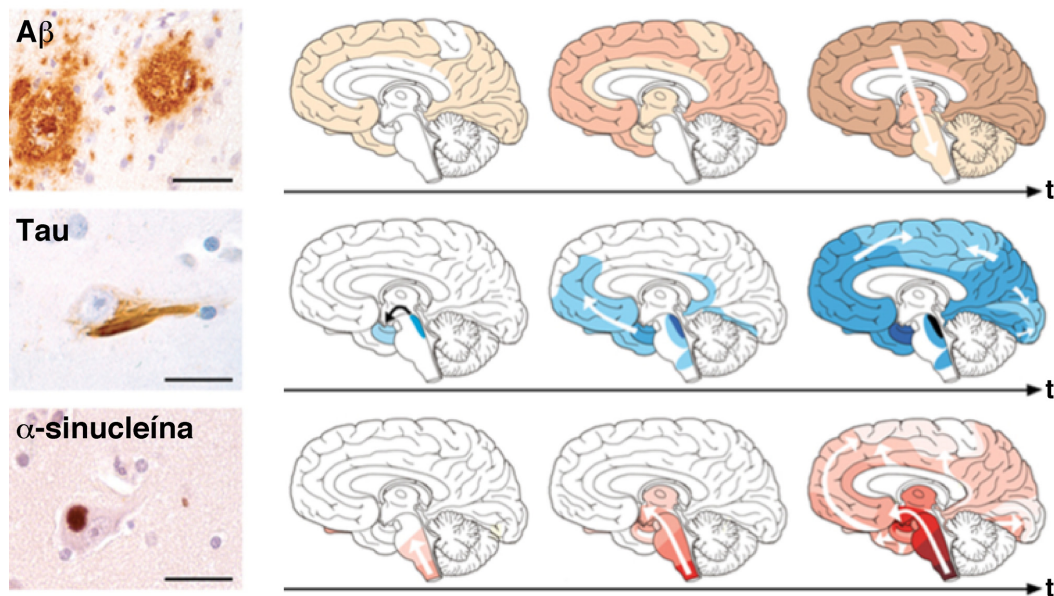


Figura 6: Depósitos de distintas proteínas amiloides (A β , Tau y α -sinucleína) y progresión característica de las lesiones producidas por las mismas en las distintas patologías neurodegenerativas. Modificado de Jucker y Walker, 2013.

Otras enfermedades neurodegenerativas clínicamente relevantes causadas por la agregación amiloide de proteínas son la esclerosis lateral amiotrófica familiar (ALSf), en la que la agregación de la superóxido dismutasa 1 (SOD-1), causada por mutaciones en el gen que la codifica, se relaciona con la clínica de la enfermedad (Munch y col., 2011); y la enfermedad de Huntington, producida por la presencia de agregados amiloides de versiones expandidas (>35 repeticiones) de las repeticiones de secuencias (CAG) que

codifican para glutamina en el extremo N-terminal de la proteína huntingtina (Reddy y Housman, 1997)

Las amiloidosis pueden, asimismo, presentarse de manera sistémica afectando distintos órganos y tejidos. Entre ellas destacan: i) la amiloidosis relacionada con la diálisis (DRA), caracterizada por la acumulación en las articulaciones y órganos de depósitos amiloides de β 2-microglobulina, en el suero de pacientes que sufren disfunción renal (Eichner y Radford, 2011b); ii) La amiloidosis de la proteína amiloide A (AA) del suero o amiloidosis asociada a la inflamación, se debe al procesamiento proteolítico de la proteína AA en fragmentos con capacidad para formar fibras que se depositan preferencialmente en riñón, hígado y bazo (Blancas-Mejía y Ramirez-Alvarado, 2013) y iii) la enfermedad pulmonar intersticial, en la que mutaciones en el dominio BRICHOS de la preproteína del surfactante pulmonar desencadenan su deposición amiloide (Willander y col., 2012).

3. Mecanismos de toxicidad amiloide

La funcionalidad de las proteínas en el interior celular requiere de mecanismos de control que comúnmente se incluyen bajo la denominación de homeostasis proteica y que supervisan la síntesis, el plegamiento y ensamblaje/desensamblaje en complejos multiproteicos funcionales, así como las modificaciones postraduccionales y los procesos de degradación, tráfico y localización subcelular. Entre los procesos reguladores de la homeostasis de proteínas se encuentran la respuesta por choque térmico (*Heat shock response*, HSR) y la respuesta a proteínas desplegadas (*Unfolded protein response*, UPR), análoga a la HSR; y los mecanismos de autofagia esenciales para la degradación de proteínas agregadas u orgánulos dañados (Narayan y col., 2014). Estos últimos son especialmente importantes en células postmitóticas como las neuronas, en las que la pérdida de agregados y orgánulos dañados no puede hacerse por dilución durante la división celular (Mizushima y col., 2008). El desarrollo de las proteinopatías ligadas a la acumulación en depósitos proteicos de naturaleza amiloide conlleva, generalmente, alteraciones en estos mecanismos de control.

La toxicidad amiloide se atribuye a especies oligoméricas de pequeño tamaño, intermediarias en el proceso de agregación y formación de fibras amiloides, que exponen muchos más residuos que los agregados grandes y las fibras estructuradas. Dichos residuos, que en condiciones de plegamiento normal se encuentran ocultos en el núcleo

hidrofóbico de la proteína, son capaces de mediar interacciones aberrantes con distintos componentes celulares (metabolitos, otras proteínas y macromoléculas) alterando el funcionamiento de la maquinaria celular (Chiti y Dobson, 2006). Se han descrito distintos mecanismos, no excluyentes entre sí, a través de los cuales las proteínas amiloides generan toxicidad: i) pérdida de función, al agregar y dejar de realizar su función fisiológica y ii) ganancia de función, que comprende tanto la capacidad de interactuar con proteínas esenciales para la fisiología de la célula, coagregándolas y reduciendo así su disponibilidad (Bolognesi y col., 2010; Chiti y Dobson, 2006), como la interacción directa con membranas celulares, comprometiendo su integridad (Kagan y col., 2004; Lashuel y Lansbury, 2006)

El aumento en la permeabilidad celular y en la concentración de calcio intracelular han sido asociados con la toxicidad amiloide (Kagan y col., 2004; Mattson, 1994). Proteínas amiloides como el péptido A β , α -sinucleína y proteínas ricas en poliglutamina son capaces de formar poros discretos en las membranas celulares (Arispe y col., 1994; Arispe y col., 1993; Hirakura y col., 2000; Lashuel y col., 2002). Asimismo, la adición de oligómeros a vesículas fosfolípídicas produce la liberación de fluoróforos encapsulados en su interior, indicando la permeabilización de la membrana (Anguiano y col., 2002; Glabe, 2006). Dicha permeabilización podría iniciar distintas rutas implicadas en la patogénesis como: i) la generación de ROS (Schubert y col., 1995); ii) alteración en las vías de señalización celular (Mattson, 1995; Saitoh y col., 1993), muchas de ellas reguladas por la concentración de calcio y la despolarización de la membrana incluyendo la regulación a la alta de los mecanismos de autofagia y muerte celular, y iii) disfunción mitocondrial (Hashimoto y col., 2003). La permeabilización de la membrana mitocondrial supone una disminución en los niveles de ATP, necesarios para los mecanismos de proteostasis pues chaperonas y proteosoma requieren ATP para llevar a cabo su función (Glabe, 2006).

4. Sistemas modelo para el estudio de las amiloidosis

El diseño y desarrollo de fármacos que permitan revertir el proceso de amiloidogénesis presenta dificultades a varios niveles. Las conexiones entre las distintas vías de homeostasis de proteínas no están claramente identificadas, por lo que es difícil modificar la de una proteína concreta sin afectar a otras. Además, la mayoría de las proteínas implicadas en los procesos de amiloidosis no presentan, como consecuencia de su polimorfismo, estructuras claramente definidas sobre las que diseñar moléculas

inhibidoras del proceso de agregación. Debido a esto, el diseño de compuestos se ha dirigido a la modulación de factores como chaperonas (Hay y col., 2004; Jackrel y col., 2014), moduladores de la respuesta por choque térmico (HTS) (Calamini y col., 2012), de la autofagia (Sarkar, 2013), y de actividades enzimáticas concretas, como la β -secretasa en la enfermedad de Alzheimer (Mecozzi y col., 2014).

Dada la complejidad que subyace a las proteinopatías amiloides, se han desarrollado distintos sistemas modelo donde poder profundizar en las bases biológicas y realizar estudios de cribado a gran escala de compuestos inhibidores de amiloidosis. La gran conservación a nivel evolutivo de los mecanismos de homeostasis de proteínas entre distintos organismos dota de un gran potencial a los sistemas modelo para estudiar los procesos complejos que tienen lugar en las enfermedades humanas (Narayan y col., 2014).

4.1. Sistemas modelo de amiloidosis en animales

En el ratón las patologías amiloides se inducen de varias formas alternativas: (i) mediante injertos, inoculación de extractos cerebrales de animales enfermos y pases de las proteínas amiloides (Chandler, 1961) o inoculación de agentes químicos directamente en el tejido cerebral de un animal sano (Neha y col., 2014); (ii) manipulando la expresión génica de las proteínas implicadas mediante la sustitución de proteínas silvestres por mutantes, la sustitución de la proteína propia de ratón por el transgen heterólogo procedente de otra especie o sobreexpresión de las proteínas implicadas (Watts y Prusiner, 2014). Sin embargo, el gran coste derivado del mantenimiento de los animales, la dificultad en su manejo dado el gran tamaño de muestra necesario para realizar los ensayos, la complejidad de los organismos y el hecho de que no siempre reproducen la patología al exceder el tiempo de incubación de la misma la esperanza de vida del animal (Watts y Prusiner, 2014), ha provocado la búsqueda y desarrollo, durante las últimas décadas, de nuevos sistemas modelo simples en organismos no mamíferos cuyas características principales se resumen en la Figura 7 y entre los que destacan el nemátodo *Caenorabditis elegans* y el díptero *Drosophila melanogaster*.

El nemátodo *C. elegans* ha sido ampliamente utilizado para el estudio de enfermedades neurodegenerativas debido a la conservación de proteínas ($\approx 80\%$) con los vertebrados (Lai y col., 2000) y a que posee tejidos diferenciados, incluyendo un sistema nervioso (White y col., 1986). Además de su transparencia, que permite la toma directa de

imágenes de microscopía de fluorescencia sobre los tejidos *in vivo* (Chalfie y col., 1994; Chung y col., 2008), posee un tamaño pequeño, un tiempo de generación y una esperanza de vida cortos, lo que le hace idóneo para ensayos a gran escala (Fatouros y col., 2012; Nussbaum-Krammer y Morimoto, 2014). Asimismo, es posible expresar proteínas heterólogas en distintos tejidos dando lugar a fenotipos específicos.

Por su parte, *D.melanogaster* es un organismo más complejo que posee en su sistema nervioso además de neuronas y células gliales, una barrera hematoencefálica (Mayer y col., 2009), lo que permite realizar estudios sobre regiones cerebrales funcionales e interacciones neuronales complejas implicadas en los procesos de neurodegeneración, ligados a la expresión de genes de manera tejido-específica (Brand y Perrimon, 1993). Por ejemplo, el fenotipo del ojo rugoso en el que éste pierde su regularidad característica al expresar proteínas proteotóxicas (Luheshi y col., 2007), se ha empleado como marcador para el estudio de diversas proteinopatías. La expresión de proteínas relacionadas con estas enfermedades produce, también, la generación de inclusiones proteicas, así como neurodegeneración específica, alteraciones motoras y anormalidades en las alas (Bilen y Bonini, 2005). Entre las proteínas implicadas en amiloidosis que han sido expresadas en estos sistemas modelo se encuentran el péptido A β (Link, 1995; Iijima y col., 2004), tau (Fatouros y col., 2012; Wittmann y col., 2001), α -sinucleína (Lakso y col., 2003; Feany y Bender, 2000), PrP (Thackray y col., 2012) y el dominio priónico del prion de levaduras Sup35p (Nussbaum-Krammer y col., 2013), generando todas ellas alteraciones fenotípicas características.





	 <i>E.coli</i>	 <i>S.cerevisiae</i>	 <i>C.elegans</i>	 <i>D.melanogaster</i>
Facilidad de manipulación bioquímica	++++	+++	++	++
Facilidad de manipulación genética	++++++	++++	++	+++
Presencia de subtipos neuronales	-	-	++	++
Tiempo de generación	30 min	2h	3-4 d	10 d
Facilidad de adquisición de imágenes	+++++	+++	+++	+

Figura 7: (A) Tabla comparativa de las principales características de distintos sistemas modelo para el estudio de enfermedades neurodegenerativas. Modificada de Narayan y col., 2014.

4.2. Levaduras: *Saccharomyces cerevisiae*. El prion [PSI⁺]

S. cerevisiae es un organismo eucariota unicelular sencillo que, aunque obviamente carece de tejido nervioso diferenciado, presenta conservados muchos aspectos fundamentales de la biología de eucariotas superiores (Khurana y Lindquist, 2010). Entre estos se incluyen la presencia de orgánulos, citoesqueleto de actina y tubulina, chaperonas, rutas de degradación de proteínas vía ubiquitina-proteasoma, autofagia, peroxisomas, mecanismos de apoptosis, tráfico vesicular, metabolismo lipídico complejo y vías de transducción de señales (Narayan y col., 2014). Presenta tiempo de generación corto y se dispone de múltiples y potentes herramientas para manipular de manera sencilla su expresión génica.

La mayor contribución científica de este sistema al estudio de las amiloidosis ha sido el descubrimiento de los priones de levadura y el estudio de su biología subyacente que han permitido ampliar el conocimiento de las bases moleculares de la conformación amiloide, el polimorfismo estructural y la transmisibilidad de este tipo de agentes (Tessier y Lindquist, 2009). El más estudiado de todos ellos es, sin duda, el prion [PSI⁺], determinante epigenético correspondiente a la proteína Sup35p.

Estudios pioneros realizados por Reed Wickner sugirieron la capacidad de Sup35p de producir cambios fenotípicos heredables en levaduras a través de un mecanismo basado exclusivamente en herencia citoplasmática de formas agregadas de la proteína, pero no en ácidos nucleicos que codificasen la información, siguiendo la hipótesis de “sólo proteína” acuñada para la proteína priónica PrP (Wickner, 1994; Wickner y col., 1995). Esta hipótesis fue corroborada posteriormente a través de estudios genéticos, bioquímicos y celulares (Chernoff y col., 1995; Glover y col., 1997). Además mediante ensayos de sedimentación diferencial se demostró que en lisados de células con fenotipo [PSI⁺], Sup35p aparecía en la fracción del sedimento, mientras que en fondo genético [*psi*⁻] se localizaba en el sobrenadante (Patino y col., 1996; Paushkin y col., 1997) corroborando que el estado agregado de Sup35p es el determinante del fenotipo [PSI⁺].

Sup35p, codificada en el gen *SUP35*, es un factor de terminación de la traducción (eRF3). La proteína está estructurada en tres dominios (Figura 8B): i) un dominio N-terminal (N) rico en residuos polares sin carga (Liu y Lindquist, 1999), no esencial para su funcionalidad e implicado en la aparición y mantenimiento del fenotipo [PSI⁺]. El dominio N está subdividido a su vez en dos regiones: una región N-terminal rica en G/Q y una

región con 5,5 repeticiones oligopeptídicas (OPR) imperfectas de la secuencia PQGGYQQYN, que recuerdan a las repeticiones presentes en PrP (Parham y col., 2001; Ter-Avanesyan y col., 1994). ii) Un dominio central (M) altamente cargado, rico en residuos de lisina (18,5%) y glutamato (17,7%), que promueve el estado no priónico soluble de la proteína (Liu y col., 2002). Según estudios de RMN en estado sólido, ambos dominios (N y M) presentan estructura en lámina-β paralela (Shewmaker y col., 2006) y son responsables de la existencia de Sup35p en dos estados, amiloide y soluble, constituyendo el dominio formador del prion (PrD) (Glover y col., 1997). iii) Por último, el dominio C-terminal se encarga de la terminación traduccional en un proceso dependiente de GTP. En las células *[PSI⁺]*, Sup35p polimeriza a través de su dominio priónico NM reduciendo la actividad de terminación de la traducción (Patino y col., 1996; Wickner y col., 1995); al conllevar la lectura corrida de los codones de terminación presentes en el ARNm (Figura 8A), generando diversidad en el proteoma que resulta en fenotipos ventajosos como respuesta rápida a algunas condiciones ambientales extremas (Eaglestone y col., 1999; True y col., 2004).

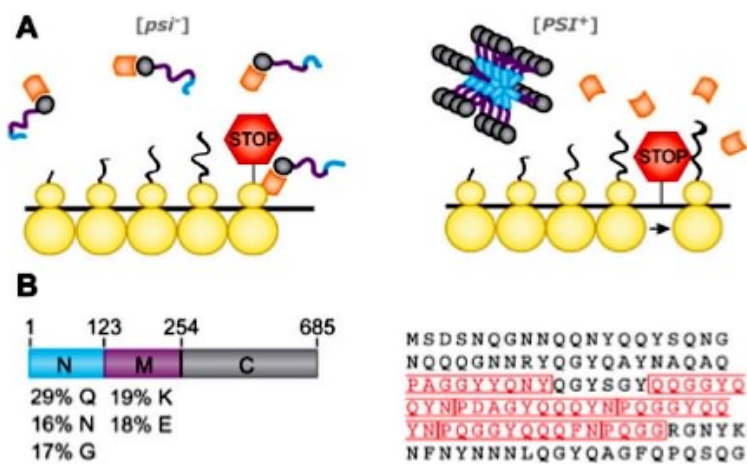


Figura 8: (A) Esquema del funcionamiento de Sup35p en células con fenotipo *[psi⁻]* y *[PSI⁺]*. En las primeras la proteína soluble y funcional interacciona con eRF1 (naranja) reconociendo el codón de terminación (*stop*), en el ARN mensajero. Sin embargo en las células con fenotipo priónico, los agregados de Sup35p no reconocen el codón de terminación produciéndose la lectura corrida del mismo. (B) Esquema de la organización estructural de Sup35p. Se muestran los dominios N, M y C y la secuencia de las repeticiones de la región OPR del dominio N. Tomado de Tessier y Lindquist, 2009.

El fenotipo *[PSI⁺]* se puede monitorizar mediante ensayos con genes reporteros, como *ADE1* (*ade1-14^{UGA}*) ó *ADE2* (*ade2-1^{UAA}*). La base de estos ensayos reside en la diferencia fenotípica de coloración de células de *S. cerevisiae* que portan alelos *ade* con un codón sin sentido prematuro. Cuando Sup35p es soluble y funcional (células *[psi⁻]*), la terminación de la traducción prematura de los genes reporteros conlleva la acumulación del intermediario metabólico previo de la ruta de síntesis de la adenina, al no ser procesado por las proteínas Ade1p/Ade2p. Dicho metabolito presenta coloración roja y dota de ese

color a las células en las que se acumula, [*psi*]. Sin embargo, en las células [*PSI*⁺], en las que Sup35p se encuentra en su mayoría agregada, se produce la lectura corrida del codón de terminación prematuro, sintetizándose proteínas Ade1p/Ade2p funcionales capaces de procesar al metabolito que produce la coloración. De esta manera las células [*PSI*⁺] presentan una coloración entre blanca y rosada, dependiendo del grado de supresión del codón *stop* (Wickner y col., 2007).

La distinción sencilla entre los dos estados conformacionales de la proteína Sup35p, permite utilizar el sistema [*PSI*⁺] como modelo para explorar el potencial amiloidogénico de secuencias heterólogas y caracterizarlas utilizando el ensayo previamente descrito (Parham y col., 2001; Tank y col., 2007; von der Haar y col., 2007; Gasset-Rosa y Giraldo, 2015).

Entre las desventajas de los priones de levadura, destacan el hecho de que no generan toxicidad clara en las células que los heredan y la baja complejidad en la composición de residuos de sus secuencias amiloidogénicas, ricas en G/Q como la Huntingtina, pero no representativas de las secuencias hidrofóbicas características del resto de proteínas amiloides. Sin embargo, al igual que en el resto de sistemas modelo descritos anteriormente, el sistema de levaduras se ha utilizado para expresar proteínas heterólogas relacionadas con enfermedades neurodegenerativas. El objetivo de estos ensayos es caracterizar los fenotipos que aparecen a causa de la expresión de la proteína tóxica para realizar, posteriormente, ensayos de cribado de compuestos que sean capaces de revertirlos. Otro tipo de aproximaciones se han basado en la expresión del dominio priónico de Sup35p (Sup35-NM) y Ure2p en organismos distintos de *S. cerevisiae* demostrando su capacidad de propagación como prion en células de mamífero (Krammer y col., 2009; Zhang y col., 2010) y *Escherichia coli*, aunque manteniendo el requerimiento de cofactores de levadura como el prion [*PIN*⁺] (Garrity y col., 2010).

Como parte de esta Tesis Doctoral se ha desarrollado un sistema sintético análogo, diseñado según las bases moleculares del prion [*PSI*⁺] y la secuencia amiloidogénica del dominio WH1 de RepA (ver Introducción 4.2.), en un sistema modelo aún más simple, *E. coli*, en el que RepA-WH1 genera una proteinopatía.

4.3. Bacterias: *Escherichia coli*

Como se describe en el apartado 2.2, todos los amiloides funcionales identificados en bacterias son extracelulares, secretados al medio para desempeñar distintas funciones, no

habiéndose descrito amiloides bacterianos intracelulares hasta la fecha. Este hecho, sumado a que la mayoría de las proteínas amiloides forman cuerpos de inclusión cuando se sobreexpresan en *E. coli* (de Groot y col., 2009), ha limitado durante mucho tiempo su uso a la posterior purificación y replegado para su caracterización *in vitro* (Caldinelli y col., 2013; Villar-Piqué y col., 2012). La expresión de priones heterólogos en bacterias genera o bien toxicidad, como se ha demostrado para el dominio NM de Sup35 (Garrity y col., 2010), o bien proteínas funcionales: por ejemplo la inoculación en ratones de proteína PrP recombinante producida en *E. coli* es capaz de desencadenar la enfermedad priónica (Wang y col., 2010).

Los cuerpos de inclusión constituyen un caso particular ya que, aunque presentan cierto carácter amiloide (de Groot y col., 2009; Morell y col., 2008; Wang y col., 2008) la estructura fibrilar en ellos no es obvia, dado que en estas inclusiones se depositan otras proteínas, como chaperonas, componentes ribosómicos e incluso ácidos nucleicos. Los cuerpos de inclusión se acumulan en las células en número reducido (1 ó 2 por célula) y en posiciones subpolar o central. Experimentan una herencia asimétrica en la división, acumulándose en uno de los dos polos, lo que resulta en la reducción de la viabilidad en sólo una de las dos células hijas (Lindner y col., 2008; Winkler y col., 2010). Las bacterias son, pues, capaces de segregar las proteínas dañadas, a expensas del envejecimiento individual de las células que heredan el polo viejo (Lindner y col., 2008). Existen discrepancias sobre si dicha segregación asimétrica se debe a un mecanismo de transporte activo (Rokney y col., 2009) o a un fenómeno pasivo de exclusión por el nucleoide (Winkler y col., 2010).

Dados el tiempo de generación rápido de las bacterias (30 minutos como promedio), su numerosa progenie, simplicidad y facilidad de cultivo, la disponibilidad de multitud de herramientas para manipular su expresión génica y su relación evolutiva con el principal orgánulo afectado de manera común en las proteinopatías (la mitocondria), *Escherichia coli* supone, potencialmente, un sistema mínimo sobre el que desarrollar un proceso amiloidogénico *de novo*, utilizando herramientas de Biología Sintética[†]. En este contexto, en los últimos años los estudios realizados en nuestro laboratorio con el dominio WH1 de la proteína RepA nos ha permitido caracterizarla como el primer prionoide bacteriano sintético (Fernández-Tresguerres y col., 2010), constituyendo hasta la fecha el único

[†] La Biología sintética comprende el diseño y construcción de nuevas partes biológicas, dispositivos y sistemas, así como el rediseño de sistemas biológicos naturales ya existentes, para aplicaciones útiles. (www.syntheticbiology.org)

sistema modelo de tales características para el estudio en bacterias de proteinopatías amiloides.

5. La proteína RepA-WH1 del plásmido pPS10 de *Pseudomonas*: Un modelo de amiloidosis en bacterias

Durante 20 años, nuestro grupo ha estudiado la dinámica de la proteína RepA en el inicio de la replicación del plásmido pPS10. El gran conocimiento adquirido a nivel molecular sobre los procesos subyacentes, nos ha permitido diseñar, validar y caracterizar un modelo sintético que reúne la mayoría de características de las proteínas amiloides, tal y como se describe en los apartados siguientes.

5.1. La proteína RepA en la replicación del plásmido pPS10

Las proteínas de tipo Rep median el inicio de la replicación del ADN plasmídico, reconociendo el origen de replicación y promoviendo el ensamblaje de un complejo que sirve como punto de anclaje al resto de la maquinaria replicativa celular (Giraldo, 2003; Giraldo y Fernández-Tresguerres, 2004).

RepA es la proteína iniciadora de la replicación del plásmido pPS10, un replicón específico de *Pseudomonas savastanoi* (Nieto y col., 1992), que presenta un mecanismo replicativo de tipo *theta*. Está compuesta por dos dominios del tipo *winged-helix* (WH): WH1 y WH2 situados en las posiciones amino y carboxilo terminal de la misma, respectivamente (Giraldo y col., 1998). El replicón mínimo del plásmido pPS10 contiene el origen de replicación (*oriV*) y el gen (*repA*) que codifica para la proteína RepA. El *oriV* está formado por una caja *dnaA* (reconocida por el iniciador cromosómico DnaA), cuatro repeticiones directas idénticas de una secuencia de 22 pares de bases (bp) cada una, denominadas iterones, y dos regiones ricas en G+C y A+T, respectivamente (Giraldo y Fernández-Tresguerres, 2004). La proteína RepA, de 26.7 KDa, se encuentra mayoritariamente como dímero en disolución, el cual se une con alta afinidad a una repetición invertida de 8 bp que flanquea la caja -35 del promotor del gen *repA*, a través del dominio C-terminal WH2, reprimiendo así su propia transcripción (García de Viedma y col., 1995). El dominio N-terminal WH1 de RepA constituye la superficie de dimerización de la proteína. La disociación del dímero de RepA en los monómeros que lo componen, inducida por la interacción del dímero con los iterones (Díaz-López y col., 2003; Díaz-López y col., 2006), convierte al dominio WH1 en un segundo módulo de unión

al ADN, que reconoce el esqueleto azúcar-fosfato en uno de los extremos de cada iterón. Así, la unión cooperativa de la especie monomérica de RepA al *oriV*, desencadena la replicación del ADN plasmídico (Figura 9).

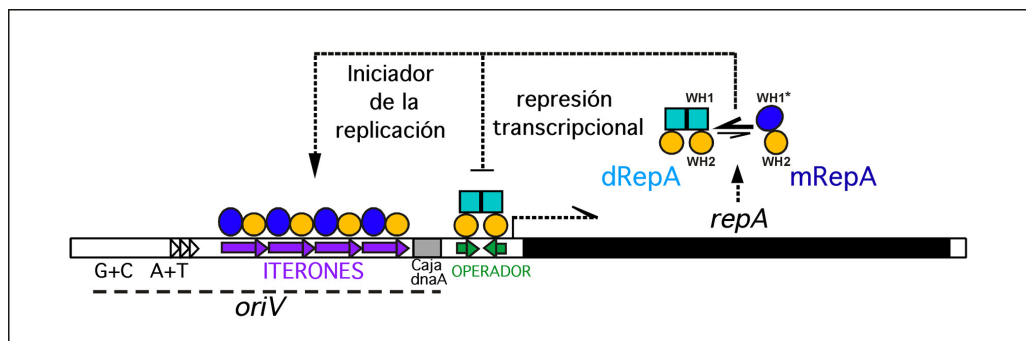


Figura 9: Esquema del replicón del plásmido pPS10. Se muestran el origen de replicación (*oriV*), y el gen de RepA. El *oriV* está formado por 4 repeticiones directas (iterones, flechas moradas), la caja de unión del iniciador cromosómico DnaA y las regiones ricas en G+C y A+T presentes en otros replicones. RepA en forma dimerizada se une al operador del gen que la codifica reprimiendo su propia transcripción, mientras que en forma monomérica se une de forma cooperativa a los iterones desencadenando el inicio de la replicación plasmídica. El dominio N-terminal de RepA (WH1) sufre un cambio conformacional al monomerizar la proteína (cuadrados celeste a óvalos azules).

Los dímeros aislados del dominio WH1 son termoestables y resistentes a la actividad proteolítica (Giraldo y col., 1998). La conversión de dímeros en monómeros implica un desplegamiento parcial de RepA y un aumento de la superficie de la misma expuesta al solvente, dando lugar a intermediarios metaestables con gran propensión a la agregación, (Díaz-López y col., 2003). Por lo tanto, al igual que ocurre con la proteína priónica de mamíferos (PrP) (Cordeiro y col., 2001; Deleault y col., 2007; Geoghegan y col., 2007; Nandi y col., 2002; Silva y col., 2008; Wang y col., 2010) o la α -sinucleína (Hedge y col., 2010), el dominio de dimerización de RepA sufre, tras unirse al ADN, un cambio conformacional que afecta parcialmente a 3 α -hélices del dominio N-terminal, WH1 (residuos 1-132), e implica la conversión de una de ellas ($\alpha 2$) en una hebra- β (Figura 10) (Díaz-López y col., 2003; Díaz-López y col., 2006; Giraldo y col., 2003). Este comportamiento se ha caracterizado mediante técnicas de dicroísmo circular (DC), espectroscopía de fluorescencia e hidrodinámica (Díaz-López y col., 2003; Díaz-López y col., 2006; Giraldo y col., 1998), cristalografía (Giraldo y col., 2003) y modelado molecular (Giraldo y Fernández-Tresguerres, 2004).

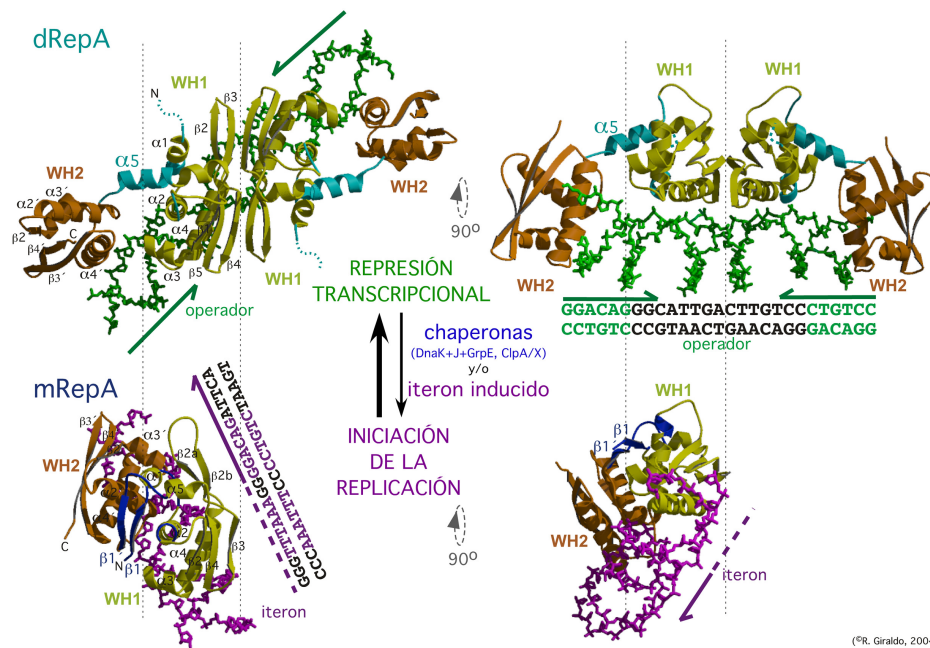


Figura 10: Dinámica de conversión de dímero a monómero de RepA. En verde se representa la secuencia del operador donde el dRepA se une para reprimir su transcripción. En morado se muestra su función como activador de la replicación plasmídica mediada por la interacción de mRepA con la secuencia de iterones. Figura modificada de Giraldo y col., 2003.

Además de regular su propia transcripción y mediar el inicio de la replicación plasmídica, RepA controla el número de copias del plásmido (Chattoraj, 2000). Una vez completada la replicación del ADN plasmídico, se genera un filamento nucleoproteico, mediante interacciones en *trans* entre los dominios WH1 de moléculas de monómeros de RepA unidas a dos copias plasmídicas recién replicadas, que inhibe, mediante impedimento estérico, nuevas rondas de replicación prematuras (Gasset-Rosa y col., 2008a).

5.2. RepA-WH1, el primer prionoide sintético bacteriano

La similitud del cambio conformacional experimentado por el dominio WH1 de RepA durante su disociación, tras interactuar con un ligando alostérico inductor, con el incremento en estructura β -laminar que experimentan PrP o α -sinucleína al adquirir su conformación amiloide, inspiraron la búsqueda de condiciones que pudiesen promover *in vitro* la amiloidogénesis de RepA-WH1 (Giraldo, 2007). Así, mediante predicciones *in silico* utilizando el algoritmo TANGO, se identificó en el dominio WH1 una región peptídica situada en el extremo C-terminal de la hélice α -2 y parte del lazo adyacente, L₂₆VLCAASLI₃₄, con un alto potencial de agregación mediado por láminas- β . Esta región se

encuentra parcialmente oculta en el núcleo hidrofóbico del dominio en el estado dimérico, quedando expuesto al solvente cuando la proteína monomeriza tras unirse a los iterones (Giraldo y col., 2003) (Figuras 11 y 13). Al incluir en la secuencia A31V, una mutación puntual, aislada recurrentemente al seleccionar mutaciones que incrementasen la eficiencia replicativa de RepA (rango de huésped y número de copias) (Fernández-Tresguerres y col., 1995; Maestro y col., 2003; Gasset-Rosa y col., 2008b) el potencial amiloide se incrementa hasta alcanzar niveles similares a los de secuencias presentes en las proteínas implicadas en las proteinopatías humanas (Giraldo, 2007).

Cuando se sintetizó un péptido con el motivo amiloidogénico de WH1, L₂₆VLCAASLI₃₄, se demostró su capacidad para ensamblarse *in vitro* en una estructura fibrilar (visualizada mediante TEM) con características biofísicas amiloides, cuya estructura en lámina β -cruzada fue confirmada mediante estudios de DC, de unión a rojo Congo (RC) y de difracción de rayos X (Giraldo, 2007) (Figura 11).

Además, ensayos *in vitro* mostraron como el dominio WH1(A31V) era capaz de ensamblarse, al combinarse con secuencias específicas de ADN (11pb), en distintas nanoestructuras amiloides que van desde esferoides hasta fibras amiloides estructuradas, en función de la secuencia de ADN que desencadene la transformación de hélice- α a hebra- β (Giraldo, 2007)(Figura 12). Concretamente, la secuencia de ADN correspondiente a las repeticiones directas (iterones) (5'GGGTTTAAAGG/5'CCCAAATTTCC) provoca la aparición de agregados de gran tamaño y esferoides, al igual que, en menor medida, lo hacen las secuencias inespecíficas de ADN analizadas. Sin embargo, la secuencia de la región *opsp* (ligando inductor), correspondiente a la región espaciadora situada entre las repeticiones invertidas presentes en el operador del gen *repA* (5'CATTGACTTGT/5'ACAAGTCAATG), es capaz de inducir la formación de fibras amiloides estructuradas de 25 nm de ancho, visualizadas mediante TEM y caracterizadas como amiloides por su unión a RC. La unión de WH1 al ADN, que es de baja afinidad (Díaz-López y col., 2006; Giraldo y col., 1998), debe de ser transitoria ya que el ADN no forma parte de los amiloides que se generan (Giraldo, 2007). Esto sugiere que el ensamblaje ordenado de la proteína en fibras amiloides está dirigido por interacciones electrostáticas entre secuencias específicas del ADN y WH1, actuando el ácido nucleico como catalizador en condiciones cuasi-fisiológicas. Mediante modelado *in silico* de moléculas de pequeño tamaño que interfiriesen la unión ADN-RepA, se identificó un derivado tetrasulfonado del colorante índigo, capaz de inhibir la amiloidosis *in vitro*, constituyendo una prueba de que

el ADN es un inductor alostérico de la amiloidogénesis (Gasset-Rosa y col., 2008b) (Figura 12). Esta fue la primera vez que se inhibió la amiloidosis de una proteína modulando un ligando alostérico, en lugar de utilizar como diana la estructura β -cruzada.

Asimismo, se ha demostrado la transmisibilidad molecular de RepA-WH1: la adición de agregados purificados a partir de lisados celulares a preparaciones de proteína RepA-WH1 (A31V) soluble promueve, *in vitro*, la agregación de ésta y su ensamblaje en fibras amiloides, indistinguibles de las producidas en presencia del efector alostérico *opsp* actuando, por tanto, los agregados amiloidogénicos como núcleos o “semillas” (Fernández-Tresguerres y col., 2010). Las fibras de RepA están formadas por 6 protofibras compuestas cada una de ellas, a su vez, por 2 protofilamentos constituidos por monómeros del dominio WH1 de RepA, cuya estructura ha sido resuelta mediante estudios de microscopía electrónica (Torreira y col., 2015) (Figura 13). La demostración *in vivo* de esa capacidad moldeadora del prionoide RepA-WH1 (Molina-García y Giraldo, 2014) ha constituido uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral y se discutirá en profundidad en un capítulo específico de la misma.

Recientemente se ha demostrado la capacidad de la variante hiperamiloidogénica RepA-WH1(A31V) de causar una proteinopatía amiloide en *Escherichia coli*, caracterizándose así como el primer prionoide bacteriano sintético (Fernández-Tresguerres y col., 2010). La expresión del dominio WH1(A31V) de RepA fusionada a una proteína reportera fluorescente (mCherry/mRFP) (Figura 14A), en presencia de múltiples copias de la secuencia inductora *opsp*₁₈, produce, *in vivo*, su acumulación en las células a modo de inclusiones citoplásmicas fluorescentes de naturaleza amiloide, transmisibles verticalmente (de célula madre a célula hija), que provocan un aumento de unas cinco veces en el tiempo de generación celular (Fernández-Tresguerres y col., 2010) (Figura 14B). Estas inclusiones se tiñen además con el fluoróforo BTA-1, un derivado de Tioflavina-T que se une a la estructura β -cruzada amiloide (Fernández-Tresguerres y col., 2010; Gasset-Rosa y col., 2014).

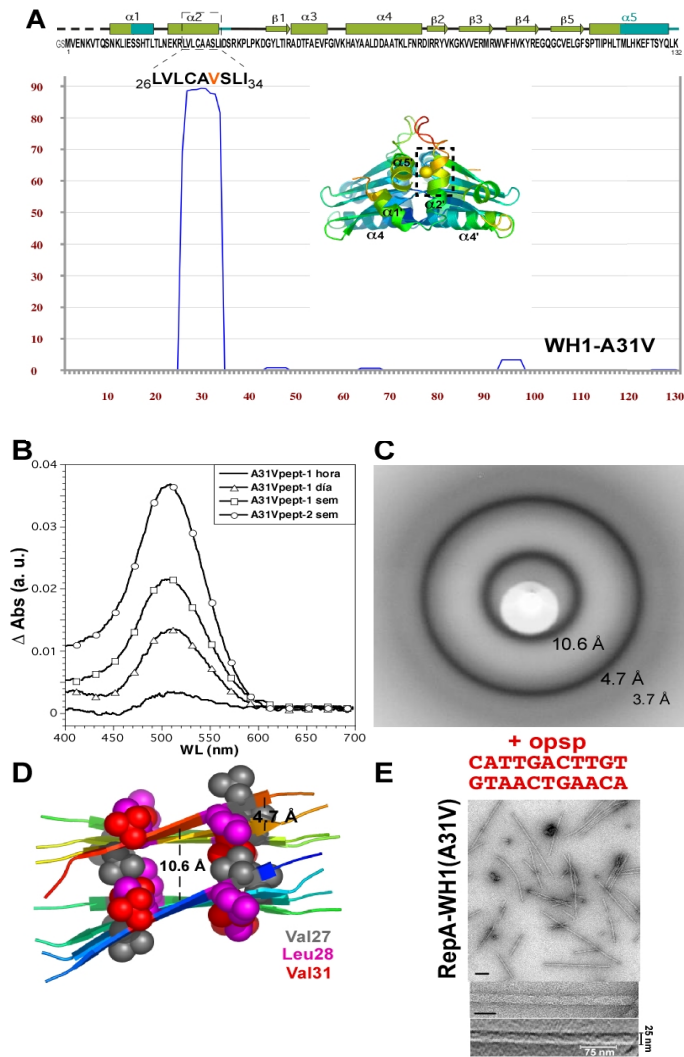


Figura 11: Caracterización biofísica de la naturaleza amiloide de RepA-WH1(A31V). **(A)** Predicción del potencial amiloide del péptido L₂₆VLCVSLI₃₄ realizada mediante el algoritmo TANGO. **(B)** Unión del péptido amiloidogénico a RC, el espectro muestra un incremento en la absorbancia a ≈500nm a lo largo del tiempo. **(C)** Patrón de difracción de rayos X del péptido amiloidogénico. Se muestra la resolución calculada para cada anillo de difracción concordante con una estructura amiloide en lámina-β cruzada. **(D)** Modelo del ensamblaje del péptido RepA-WH1(A31V). Se representan dos láminas-β distanciadas 10,6 Å formadas por hebras-β dispuestas antiparalelamente con una distancia interhebra de 4,7 Å. **(E)** Micrografía electrónica mostrando las fibras obtenidas *in vitro* tras incubar la proteína RepA-WH1(A31V) con un oligonucleótido de doble cadena que contiene la secuencia de la región *osp*, así como una visión magnificada de las mismas. Las barras representan 200 nm y 50 nm respectivamente. Figura tomada de Gasset-Rosa 2012, Tesis Doctoral. Adaptada de Giraldo, 2007.



Figura 12: Rutas alternativas propuestas para la amiloidosis de RepA-WH1(A31V). Se muestra el ensamblaje en distintas nanoestructuras amiloides según la secuencia de ADN a la que se expone la proteína (rojo secuencia *opsp*, azul secuencia de iterones, verde secuencia inespecífica). La transición rápida de hélice- α a lámina- β da lugar a agregados amorfos y esferoides mientras que la transición lenta, mediada por la región *opsp*, da lugar a fibras amiloides estructuradas. La incubación con el derivado del indigo S4 inhibe la amiloidogénesis de RepA al competir con la proteína por su unión al ADN. Imagen modificada de Gasset-Rosa y col., 2008b.

Mediante ensayos de microfluídica y microscopía de epifluorescencia a tiempos seriados (*time-lapse*) se ha caracterizado en *E. coli* el proceso de transmisión vertical de RepA-WH1(A31V)-mCherry en la progenie y los cofactores implicados en él. Además, se han identificado dos estirpes o variantes del prionoide, interconvertibles entre sí, que coexisten en poblaciones genéticamente idénticas, pero difieren en morfología y toxicidad (Figura 14C): i) una variante muy citotóxica que presenta agregados globulares múltiples distribuidos a lo largo del citoplasma y que provocan filamentación celular; y ii) otra variante con agregados elongados únicos que, aunque se transmite más eficientemente no interfiriendo con la división celular, exhibe menor toxicidad (Gasset-Rosa y col., 2014). Mientras que en los priones de levaduras las chaperonas implicadas en la transmisibilidad y mantenimiento pertenecen a la familia Hsp104 (Tuite y Cox, 2003), en el caso del prionoide RepA-WH1(A31V), su homólogo bacteriano (ClpB) no parece desempeñar un papel relevante. Sin embargo, es la chaperona de la familia Hsp70, DnaK, la que contribuye a la propagación e interconversión de estirpes del prionoide (Gasset-Rosa y col., 2014).

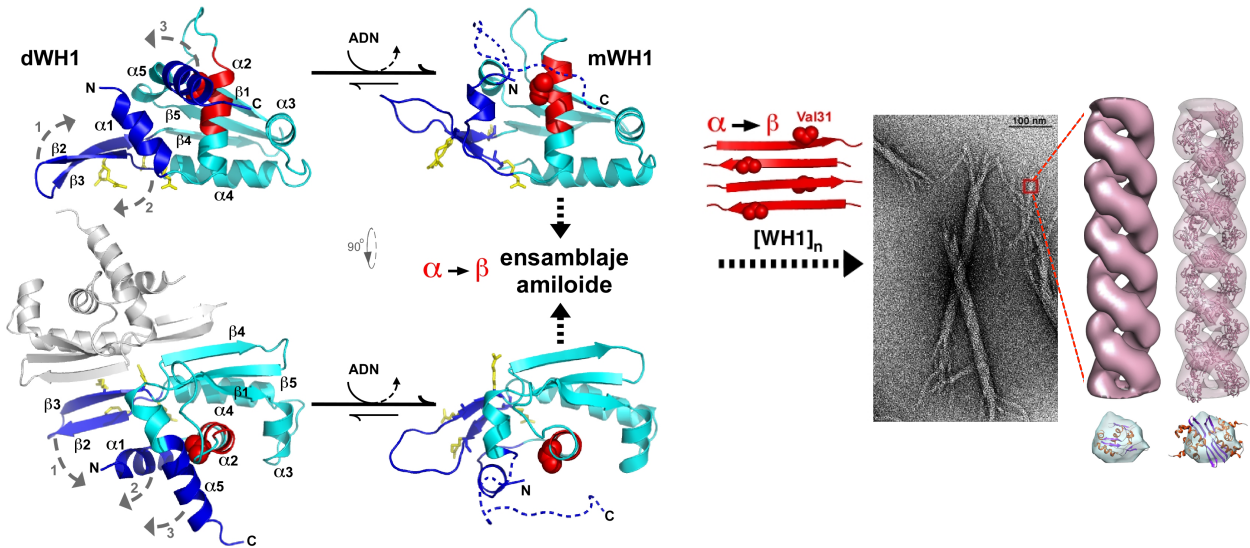


Figura 13: Modelo de los cambios conformacionales que sufre RepA-WH1(A31V) durante la amiloidogénesis. Los dímeros de RepA-WH1 (dWH1), estables y solubles, sufren un cambio conformacional tras unirse al ADN de manera transitoria generando un intermediario monomérico metaestable con tendencia a agregar (mWH1). Las regiones que no sufren modificaciones durante este proceso se representan en azul turquesa mientras que las zonas implicadas en el cambio conformacional se muestran en azul oscuro. El péptido amiloidogénico de RepA-WH1 (localizado en el extremo C-terminal de la hélice α -2 y el lazo adyacente) aparece en color rojo y el residuo Val31 se representa como esferas del mismo color. Asimismo, se muestra una posible vía de exposición de la región amiloidogénica, normalmente oculta por el dominio N-terminal del dominio WH2, mediante 3 movimientos (flechas grises discontinuas). De este modo, quedarían expuestas al solvente y se ensamblarían formando fibras amiloides *in vitro*, formadas por protofilamentos compuestos por mWH1 y cuya estructura, obtenida mediante microscopía electrónica, se muestra en rosa. Imágenes modificadas de Giraldo y col., 2011 y Torreira y col., 2015.

Datos de microscopía de fluorescencia *time-lapse*, acoplada a un sistema microfluídico, y de inmunomicroscopía electrónica mostraron cómo la sobreexpresión de DnaK desregula el balance entre ambas variantes hacia la estirpe menos tóxica, co-localizando la chaperona con los agregados elongados, sugiriendo que DnaK fragmenta los agregados grandes para generar especies oligoméricas. Éstas son resistentes a SDS y, por ello, detectables bioquímicamente mediante electroforesis en gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes, SDD-AGE. Los oligómeros así generados serían transmitidos de una manera más eficiente durante la división celular (Gasset-Rosa y col., 2014).

Para determinar el potencial amiloidogénico de RepA-WH1(A31V) y su posible transmisibilidad en un organismo heterólogo, se construyeron y expresaron quimeras en *S. cerevisiae* fusionando repeticiones en tándem del péptido amiloidogénico de RepA a la proteína Sup35p, sustituyendo así las repeticiones ricas en G/Q presentes en su dominio priónico NM. Los resultados, obtenidos por la Dra. Gasset-Rosa, muestran que dos repeticiones del péptido amiloidogénico WH1-R2 son suficientes para mantener el fenoti-

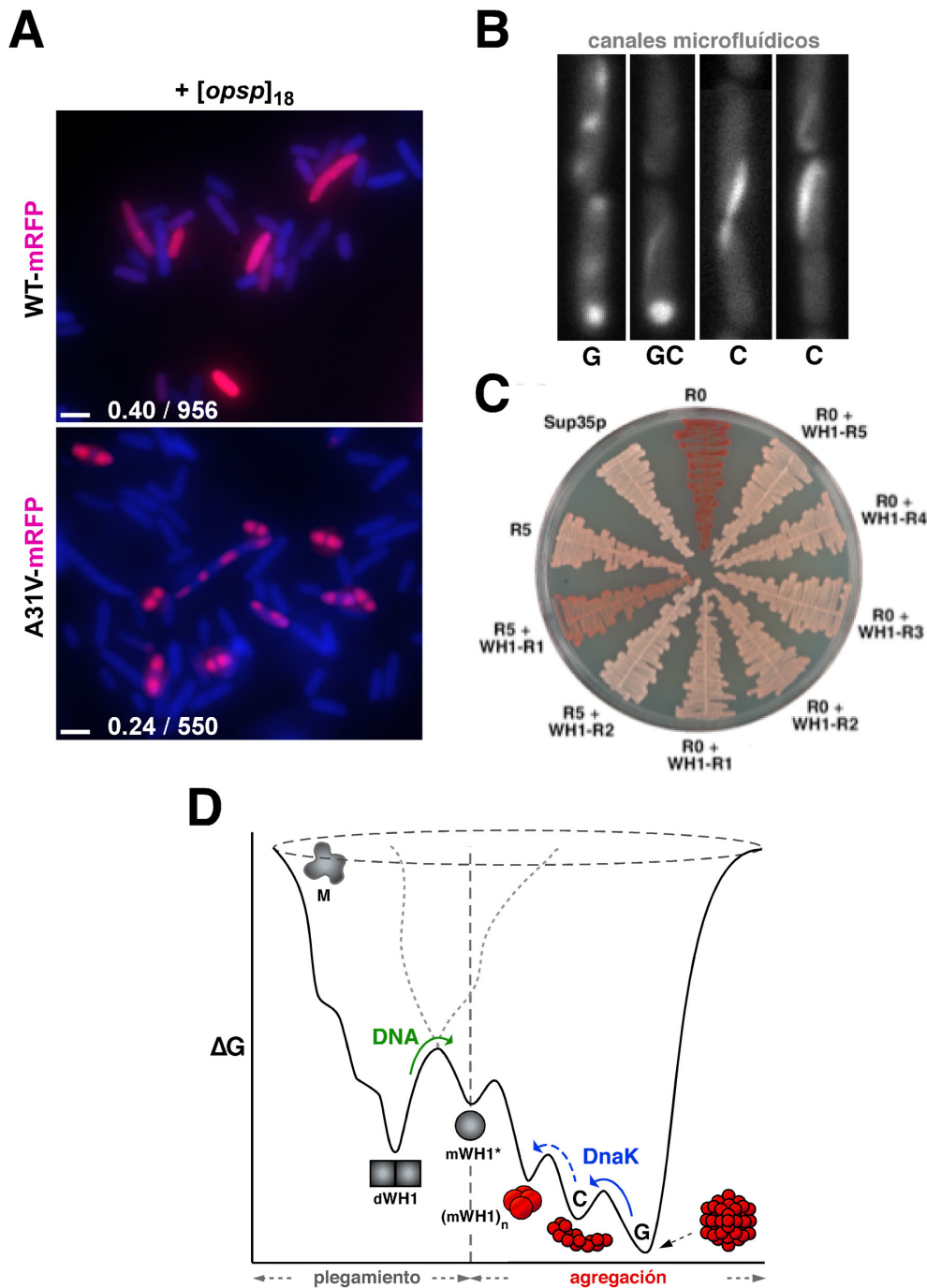


Figura 14: (A) Imágenes de microscopía de fluorescencia mostrando células de *E. coli* expresando las proteínas de fusión RepA-WH1(wt/A31V)-mRFP en presencia y ausencia de la secuencia de ADN inductora *opsp*. La expresión de la proteína hiperamiloidogénica A31V genera inclusiones citoplasmáticas fluorescentes mientras que la fluorescencia se mantiene difusa al expresar la proteína wt. Imágenes tomadas de Fernández-Tresguerres y col., 2010. (B) Imágenes de microscopía de fluorescencia en sistema microfluídico a lo largo de 10h de crecimiento en el que se pueden apreciar dos variantes del prionóide RepA-WH1(A31V): globular (G) y elongada o cometoide (C), así como la interconversión entre ambas (GC). Imagen tomada de Gasset-Rosa y col., 2014. (C) Valoración del potencial amiloide de RepA-WH1(A31V) en *S. cerevisiae*. Se muestran colonias crecidas expresando las quimeras [REP-PSI⁺] que contienen repeticiones en tándem del péptido amiloidogénico de RepA (WH1-Rn) fusionadas a Sup35p con o sin sus repeticiones propias (R5, R0). Dos repeticiones del péptido de RepA son suficientes para mantener el fenotipo priónico. Imagen tomada de Gasset-Rosa y Giraldo, 2015. (D) Esquema representando la variación de energía libre en el proceso de interconversión entre las distintas variantes de RepA-WH1(A31V) mediado por la chaperona DnaK. Imagen tomada de Gasset-Rosa y col., 2014.

po priónico blanco-rosado característico del prion [PSI⁺] en *S. cerevisiae* (ver apartado 3.2.4) (Gasset-Rosa y Giraldo, 2015) (Figura 14D). Este diseño ha sido empleado en esta Tesis como punto de partida para la construcción de un sistema reportero de agregación de proteínas aplicado a la lectura corrida de codones *stop* en *E. coli*.

A pesar de la naturaleza amiloide de los agregados del prionoide RepA-WH1, de su capacidad de transmisión vertical y de su toxicidad en las bacterias, carecen de infectividad, lo que, además de la inexistencia en el proteoma humano de una proteína con similitud significativa a la secuencia de RepA-WH1, dota a nuestro sistema modelo de una ventaja adicional con respecto al resto: la bioseguridad en su manipulación. De esta manera, RepA-WH1 es un sistema minimalista extremadamente útil para estudiar los distintos factores implicados en los procesos de amiloidogénesis y para la búsqueda de compuestos inhibidores del proceso de agregación en ensayos de cribado a gran escala de una forma rápida, específica, económica y biosegura.

II. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta los precedentes descritos en la sección introductoria, se plantearon los siguientes OBJETIVOS:

1. Caracterización de la capacidad de nucleación cruzada *in vivo* entre variantes del prionoide RepA-WH1 en *Escherichia coli*.
2. Identificación y caracterización de las vías de toxicidad celular del prionoide RepA-WH1(A31V) en *E. coli*.
3. Desarrollo de un sistema reportero en *E. coli*, basado en quimeras WH1(R_n)-RF1, para la identificación *in vivo* de secuencias proteicas con potencial amiloide y su validación por medio de compuestos inhibidores de la amiloidosis.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. MATERIALES

1. Estirpes bacterianas

Las estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo, así como su genotipo y el tipo de ensayo en el que se emplearon, se muestran en la tabla 2.

Para la clonación de genes bacterianos se emplearon las estirpes *Fusion Blue* (Clontech) y MDS42 (Pósfai y col., 2006). Ambas carecen del gen *recA*, lo que las hace deficientes en recombinación homóloga, favoreciendo así la estabilidad de secuencias repetidas como las incluidas en algunas de las construcciones empleadas en esta Tesis. Asimismo, MDS42 ha sido utilizada para los estudios fenotípicos de co-agregación de distintas variantes de RepA-WH1, y el análisis de las vías de toxicidad de RepA, ya que al tratarse de una estirpe de genoma reducido carente de secuencias de inserción, transposones, recombinasas, flagelo y distintas proteínas de membrana, no sólo favoreció la estabilidad de la proteína de fusión (Fernández-Tresguerres y col., 2010) sino que, además, simplificó el estudio genómico sobre la toxicidad del prionoide RepA-WH1. En los ensayos de sensibilidad a H₂O₂ se empleó, además, la estirpe SLC22 (*Andh*) (Woodmansee e Imlay, 2002).

Nombre	Genotipo relevante	Utilización	Referencia
<i>Fusion Blue</i>	<i>endA1 hsdR17</i> (<i>r_{K12}⁻ m_{K12}⁺</i>) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96,</i> <i>relA1, lacF'</i> [<i>proA⁺B⁺, lacI^q</i> <i>ZΔM15::Tn10(tet^R)</i>]	Clonación	Bullock y col.,1987
MDS42	MG1655 <i>recA⁻</i>	Colocalización de variantes del prionoide RepA-WH1 Análisis de la toxicidad del prionoide RepA-WH1	Pósfai y col., 2006
MRA8	MG1655 <i>prfA^{ts}</i>	Prionoide sintético WH1-RF1	Zhang y col., 1994
MRA8Δ <i>lacZ</i>	MG1655 <i>prfA^{ts} ΔlacZ</i>	Prionoide sintético WH1-RF1	Este trabajo
SLC22	<i>F rpsL gal ndh::cam</i>	Análisis de la toxicidad del prionoide RepA-WH1	Woodmansee e Imlay., 2002

Tabla 2: Estirpes bacterianas empleadas en este trabajo

En cuanto a los experimentos de lectura corrida de codones *stop*, se llevaron a cabo en la estirpe MRA8:: $\Delta lacZ$, termosensible para el gen *prfA* que codifica para el factor de terminación de la traducción bacteriana RF1 (*release factor-1*).

2. Plásmidos

Los plásmidos empleados se agrupan en la Tabla 3. En ella se indican el nombre, marcador de selección, ensayo en el que han sido utilizados y procedencia de los mismos.

3. Medios de cultivo bacterianos

LB: 10 g/l bactotripton a, 5g/l extracto de levadura, 5 g/l NaCl (pH 7.4). De manera rutinaria se suplementó con timina (2 g/l). Para la elaboración del medio sólido se suplement a con agar bacteriológico al 1,5% (p/v).

SOC: 2% bactotripton a, 0.5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM de MgCl₂, 10mM MgSO₄ y 20 mM glucosa.

M9+ CAA: 1/10 M9 10x (176,5g/l Na₂HPO₄ ·12H₂O, 30g/l KH₂PO₄, 5g/l NaCl, 10g/l NH₄Cl), 1% Ca Mg (0,01M CaCl₂·2 H₂O, 0,1M MgSO₄·7H₂O), 1mg/ml vitamina B1, 2g/l CAA, 0,4% glucosa.

4. Reactivos

4.1. Enzimas de modificación del ADN

Las enzimas de restricción empleadas para la realización de este trabajo fueron adquiridas en las casas comerciales *New England Biolabs*, *Roche Applied Science*, *Biotoools* y *Fermentas*.

Para la amplificación del ADN mediante PCR se empleó la *Pfu* ADNpol de *Promega*. Para la mutagénesis dirigida se utilizó la enzima *Pfu* turbo ADN polimerasa de *Stratagene*. Por último, para la comprobación de colonias mediante PCR se usó la *Taq* ADN polimerasa de *Biotoools*.

Para la clonación de fragmentos de ADN se usó la T4 ADN ligasa de *Promega* o de *Roche*.

Se empleó el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, la RNasa A, la proteinasa K y la fosfatasa alcalina antártica de la casa comercial *New England Biolabs*. La T4 polinucleótido Kinasa fue adquirida a la casa comercial *USB* y la lisozima a *Sigma-Aldrich*.

Nombre	Genotipo relevante	Utilización	Referencia
pACYC184	C ^R ; Tc ^R , p15A, n ^o copias intermedio	Vector de clonación para serie amarilla	<i>New England Biolabs</i>
pSEVA121	Am ^R , RK2, n ^o copias bajo	Vector de clonación para serie roja	Silva-Rocha y col., 2013
p3YFP	Am ^R , YFP	Amplificación YFP	Laboratorio del Dr. Ariel Lindner (INSERM U1001)
pRG- WH1(WT/A31V)-mCherry	Am ^R ; <i>lacI</i> ^q ; P _{tac} -RepA-WH1(WT/A31V)-mCherry + <i>opsp18</i> , pMB9, alto n ^o copias	Amplificación inserto ; P _{tac} -RepA-WH1(WT/A31V)-mCherry, serie roja	Fernández-Tresguerres y col., 2010
pRG-WH1(ΔN37)-mCherry	Am ^R ; <i>lacI</i> ^q ; P _{tac} -RepA-WH1(ΔN37)-mCherry + <i>opsp18</i> , pMB9, alto n ^o copias	Amplificación inserto ; P _{tac} -RepA-WH1(ΔN37)-mCherry serie roja	Gasset-Rosa y col., 2014
pRG-ΔWH1-mCherry	Am ^R ; <i>lacI</i> ^q ; P _{tac} - mCherry + <i>opsp18</i> , pMB9, alto n ^o copias	Amplificación inserto P _{tac} -mCherry serie roja	Molina-García y Giraldo, 2014
pRK2- WH1(WT/Δ)-mCherry	Am ^R ; <i>lacI</i> ^q ; P _{tac} -RepA-WH1(WT/Δ)-mCherry + <i>opsp18</i> , pRK2, bajo n ^o copias	Expresión RepA-WH1(WT/Δ)-mCherry	Molina-García y Giraldo, 2014
pRK2-WH1(A31V/ΔN37)-mCherry	Am ^R ; <i>lacI</i> ^q ; P _{tac} -RepA-WH1(A31V/ΔN37)-mCherry + <i>opsp18</i> , pRK2, bajo n ^o copias	Expresión RepA-WH1(A31V/ΔN37)-mCherry	Gasset-Rosa y col., 2014
pRG-WH1(WT/A31V/ΔN37/Δ)-YFP	C ^R ; <i>lacI</i> ^q ; P _{tac} -RepA-WH1(WT/A31V/ΔN37/Δ)-YFP _{A206K} + <i>opsp18</i> , pMB9, alto n ^o copias	Amplificación inserto ; P _{tac} -RepA-WH1(WT/A31V/ΔN37/Δ)-YFP serie amarilla	Este trabajo
p15A-WH1(WT/A31V/ΔN37/Δ)-YFP	C ^R ; <i>lacI</i> ^q ; P _{tac} -RepA-WH1(WT/A31V/ΔN37/Δ)-YFP + <i>opsp18</i> , p15A, n ^o copias intermedio	Expresión RepA-WH1(WT/A31V/ΔN37/Δ)-YFP	Molina-García y Giraldo, 2014
pFus	K ^R , P _{BAD} , <i>araC</i> , pMB9, alto n ^o copias	Vector de clonación <i>lacZ</i>	Lobato-Márquez y col., 2015

Nombre	Genotipo relevante	Utilización	Referencia
pMLM132	Cm ^R , P _{parD} :: <i>lacZ</i> , mini-F	Amplificación <i>lacZ</i>	Santos-Sierra y col.,2003
pELI02	Am ^R ,P _{BAD} :: <i>prfA</i> , pBAD18	Amplificación <i>prfA</i>	Diago Navarro y col.,2009
pRG-SD1	Am ^R , SD-1, pMB9, alto n ^o copias	Vector de clonación <i>prfA</i>	Moreno-del Álamo, 2008. Tesis Doctoral
pRG-WH1(R0)-RF1	Am ^R , P _{tac} -SD-1-WH1(R0)- <i>prfA</i> , pMB9, alto n ^o copias	Amplificación P _{tac} -SD-1- <i>prfA</i>	Este trabajo
pRG-WH1(R1-4)-RF1	Am ^R , P _{tac} -SD-1-WH1(R1-4)- <i>prfA</i> , pMB9, alto n ^o copias	Extracción WH1(R1-4) por restricción	Este trabajo
pRK2-WH1(R0-4)-RF1	Am ^R , P _{tac} -SD-1-WH1(R0-4)- <i>prfA</i> , RK2, n ^o copias bajo	Expresión WH1(R0-4)-RF1	Este trabajo
pUKC1620-R0+ WH1(R1-4)	His3, 1-4 repeticiones WH1	Extracción WH1(R1-4) por restricción	Gasset-Rosa y Giraldo, 2015
pKD46	Am ^R , p _{ARA} λ red	Expresión λ red	Datsenko y Wanner., 2000
pKD267	Km ^R , Km- <i>parE</i>	Amplificación módulo Km- <i>parE</i>	Maisonneuve y col., 2011
pC1	Cm ^R , Hyper-3	Expresión constitutiva sensor Hyper-3	Bilan y col., 2013

Tabla 3: Plásmidos utilizados en este trabajo

4.2. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados (Tabla 4) fueron sintetizados en fase sólida mediante química de fosoramiditas por el Servicio de Química de Proteínas del CIB-CSIC. La síntesis de un fragmento de 300 pares de bases (pb) con 3 repeticiones de la secuencia amiloidogénica RepA-WH1(A31V) fue encargada a la empresa *ATG:biosynthetics*.

Nombre	Secuencia	Utilización
RF1 5'	cgccc g ggcccgggcgatcggaagctctggttc atccgaaagccttctatcgttgcca	Amplificación <i>prfA</i>
RF1 3'	cg gg atccttattcctgctcggacaacgc	Amplificación <i>prfA</i>
LacZ 5' SpeI	ccc act agtatgacatgattacggattcact	Amplificación <i>lacZ</i>
LacZ 3' SmaI	cg cccc gggtatttttgacaccagaccaact	Amplificación <i>lacZ</i>
Delta LacZ 5'	atagtacataatggatttccttacgcgaaatacggg cagacatggcctgctctctacccggacgcacgtg	Amplificación del módulo Km- <i>parE</i> a partir de pKD267. Extremos homólogos a <i>lacZ</i>
Delta LacZ 3'	tatgttgtgtggaattgtgagcggataacaatttca cacaggaaacagctactgatcagtgataagctgtc	Amplificación del módulo Km- <i>parE</i> a partir de pKD267. Extremos homólogos a <i>lacZ</i>
Sec mut LacZ 5'	ggtggttgaactgcacaccg	Secuenciación mutación UAG en <i>gen lacZ</i>
Mut UAA-UGA LacZ 5'	ggtctggtgtcaaaaat g accggggatcctctag	Mutagénesis <i>lacZ</i> codón de terminación UAA → UGA
Mut UAA-UGA LacZ 3'	ctagaggatccccgggt ct attttgacaccagacc	Mutagénesis <i>lacZ</i> codón de terminación UAA → UGA
Ambar LacZ 5'	gaccagcccttccc gtag gtgccgaaatggtcc	Mutagénesis codón ámbar temprano UAG en <i>lacZ</i>
Ambar LacZ 3'	ggaccatttcggcac cta cgggaagggctggtc	Mutagénesis codón ámbar temprano UAG en <i>lacZ</i>
YFP 5' BspEI	gct cc ggaatggtgagcaagggcgagg	Amplificación YFP
Mut PvuI RF1 5'	gctggggagtggcga cc gcagcgaccgtaac	Mutagénesis eliminación diana PvuI en <i>prfA</i>
Mut PvuI RF1 3'	gttacggtcgtgc g tcgccactccccagc	Mutagénesis eliminación diana PvuI en <i>prfA</i>

Nombre	Secuencia	Utilización
YFP A206K 5'	ctttgcccgttatcc C gatcatatgaaacgg	Mutagénesis YFP _{A206K}
YFP A206K 3'	ccgtttcatatgatc G ggataacgggcaaag	Mutagénesis YFP _{A206K}
SpeI 5'	gct actag ttgacaattaatcatcggctcg	Amplificación P _{tac} -cmyc-WH1(Δ/WT/A31V/ΔN37)-YFP, P _{tac} -His6-WH1(Δ/WT/A31V/ΔN37)-mCherry y P _{tac} -His6-WH1(R0)-RF1
BamHI 3'	gct ggatc cttacttgtacagctcgtccatg	Amplificación P _{tac} -cmyc-WH1(Δ/WT/A31V/ΔN37)-YFP
EcoRI 3'	agt gaattc gagctcggtag	Amplificación P _{tac} -His6-WH1(Δ/WT/A31V)-mCherry
Laclq 5' KpnI	gctc ggtac ctcgcctctacgccggac	Amplificación <i>lacI</i> ^f
Laclq 3' EcoRI	cgag gaattc tctcatgccccgcgccac	Amplificación <i>lacI</i> ^f
Laclq 3' SacI	cgag gagctc tctcatgccccgcgccac	Amplificación <i>lacI</i> ^f
Linker SmaI ½ R 5'	ggg cgcctagtgcta	Clonación media repetición amiloide WH1
Linker SmaI ½ R 3'	tagcactag ggc ccc	Clonación media repetición amiloide WH1

Tabla 4: Oligonucleótidos utilizados en este trabajo. Se muestran en gris las dianas de enzimas de restricción o las bases que se cambiaron por mutagénesis dirigida.

4.3. Secuenciación de ADN

La secuenciación se llevó a cabo por parte de la empresa *Secugen*, mediante el procedimiento de terminadores de cadena fluorescentes acoplado a electroforesis capilar. Para ello se utilizaron oligonucleótidos cebadores universales o específicos diseñados en nuestro laboratorio (Tabla 4).

4.4. Purificación de fragmentos de ADN

La purificación de ADN, extraído de gel de agarosa o tras modificación enzimática, se realizó utilizando los reactivos de *FavorPrep Gel Purification Kit (Favorgen)* y *Agarose Gelextract mini Kit (5 Prime)*. Para la extracción de fragmentos de ADN de geles de

acrilamida se utilizó un tampón 20mM Tris-HCl (pH 7,4), 20mM NaCl y 2mM EDTA (pH 8).

En algunos casos en los que se requerían grandes cantidades de ADN o el tamaño de los fragmentos estaba fuera del rango de tamaños purificables según las especificaciones de los *kits*, las muestras se fenolizaron. Para ello se añadió fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (v/v) y, tras homogeneizar, se centrifugó a máxima velocidad durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa y se precipitó con 1/10 de acetato sódico 3M pH 6 y 3 volúmenes de etanol absoluto a -20°C. Tras centrifugar (15 minutos a máxima velocidad) se lavó con etanol al 75% y el ADN se resuspendió en agua destilada ultrapura (mili-Q) o tampón TE.

El estándar de peso molecular empleado fue el escala nº1 (0,2-10 Kpb) de *REAL Biología Molecular*.

4.5. Proteínas

Para el lisado de células se utilizó la matriz de vidrio (1.0 mm ϕ , *Lysing Matrix C*) de *MP Biomedicals*.

Se utilizaron los filtros y las membranas de PVDF *Sequi-Blot* de *BioRad* para la transferencia de proteínas. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron el *Broad Range* (2-212 kDa) de *New England Biolabs* y el *Precision Blue Protein Standards* (10-250 kDa) de *BioRad*.

Para la inmunodetección de proteínas se emplearon los *kits* de luminiscencia *ECL (Plus, Prime y Advanced)* de *GE Healthcare*. Para el revelado se emplearon películas *AGFA Curix RP2*.

4.6. Anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales primarios utilizados fueron: anti-His (clon-His1) y anti-c-myc ambos de *Sigma*. Los anticuerpos secundarios policlonales empleados fueron, anti-Ig de ratón y anti-Ig de conejo, ambos conjugados a la peroxidasa de rábano (HRP) y de *GE Healthcare*.

4.7. Microscopía

Para la fijación de las muestras se utilizó 4% paraformaldehído de *Sigma* disuelto en PBS (1x). Una vez fijadas, se utilizó *Vectashield (Vector Laboratories)* como medio de

montaje, sobre portaobjetos tratados previamente con 10% polilisina (*Sigma*).

4.8. Otros

Cóctel de inhibidores de proteasas (1 píldora por cada 10 ml) de *Roche EDTA free*. Además, se utilizaron los siguientes reactivos de la casa comercial *Sigma*: ONPG (200 μ l por cada reacción de β -galactosidasa), X-Gal (40 μ g/ml), resveratrol, curcumina, quercetina, miricetina, ferrocina, neocuproine y paraquat.

B. MÉTODOS

1. Manipulación del ADN

1.1. Células competentes y transformación de *E. coli*

1.1.1. Choque térmico

Para la preparación de células competentes se utilizó el método del cloruro de rubidio (Hanahan, 1983), si se deseaba almacenar a -70°C células competentes durante largo tiempo. Si se requería emplearlas frescas, para uso en el mismo día o al siguiente, se prepararon utilizando el método del CaCl₂ (Sambrook y Pollack, 1974). En ambos casos, la transformación se llevó a cabo por choque térmico (Sambrook y Pollack, 1974).

1.1.2. Electroporación

Para la preparación de células electrocompetentes se inocularon las células de *E. coli* en medio LB, a partir de un cultivo de 500 ml crecido durante 16 h, que se creció hasta una DO₆₀₀ de 0.5-0.7. Las células se incubaron en hielo durante 20 minutos y se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se realizaron sucesivos lavados con volúmenes decrecientes (500 ml, 250 ml y 20 ml) de glicerol al 10%. Finalmente se resuspendieron en 1 ml de glicerol al 10% (v/v) y se hicieron alícuotas de 40 μ l.

A cada alícuota de células electrocompetentes frescas se añadió 1 μ l de la muestra del ADN plasmídico o mezclas de ligación y se incubó durante 5 minutos en hielo. Después se transfirió la mezcla a una cubeta de electroporación (*BioRad*, 0.2 cm de distancia entre electrodos) y en el electroporador *MicroPulser* (*BioRad*) se programó el micropulso "Ec2" (2.5kV). Posteriormente se añadió 1ml de medio SOC y se incubó durante una hora a 37°C, sembrándose a continuación en placas de LB agar con el antibiótico marcador

correspondiente.

1.2. Extracción de ADN

1.2.1. ADN plásmidico

La purificación del ADN plasmídico a pequeña escala se realizó por el método de lisis alcalina utilizando el *kit High pure plasmid isolation (Roche)*.

1.2.2. ADN genómico

Para la extracción de ADN cromosómico se utilizó el método del CTAB (Bromuro de cetil-trimetilamonio) (Murray y Thompson, 1980). A partir de un cultivo crecido durante toda la noche a 37°C en agitación, se centrifugó 1ml a máxima velocidad durante 5 minutos a 4°C. El sedimento se resuspendió en 560 µl de TE 1x a los que se añadieron 30 µl de 10% (p/v) SDS y 3 µl de proteinasa K (5g/l). Tras 1 h de incubación a 37°C, se añadieron 100 µl de 5M NaCl y 80µl de CTAB/NaCl (10g de CTAB en 100 ml NaCl 0,7M), y se incubó durante 10 minutos a 65°C. Inmediatamente después se añadió un volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se mezcló y se centrifugó a máxima velocidad a temperatura ambiente. Por último, tras recoger la fase superior, el DNA cromosómico se precipitó con 3 volúmenes de etanol y se resuspendió en agua.

1.3. Construcción de vectores de expresión

En la Tabla 4 se muestran los oligonucleótidos utilizados para la construcción de los vectores empleados en los ensayos en *E. coli*. Las construcciones se verificaron mediante restricción enzimática y secuenciación automática del ADN (*Secugen*).

1.3.1. Construcción de las fusiones WH1 (Δ /WT/A31V/ Δ N37)-mCherry/ YFP

Tanto para la construcción de la serie roja como para la de la serie amarilla, se partió de plásmidos derivados de pUC18 de alto número de copias: i) pRGrectac-His₆-WH1 (WT/A31V) (Giraldo, 2007) y pRGrectac-His₆-WH1 (Δ N37), que llevaban clonadas las fusiones del dominio WH1 con la proteína fluorescente mCherry, una variante monomérica de la proteína fluorescente roja (*monomeric red fluorescent protein*, mRFP) así como un módulo con 18 repeticiones de la región *opsp* (*opsp*₁₈) (Fernández-Tresguerres y col., 2010); ii) pRGrectac-cmyc-WH1 (WT/A31V/ Δ N37) para la serie

amarilla (obtenidos a partir de pRG-Orc42; Moreno-del Álamo y col., 2010). Además, con el objeto de monomerizar la proteína fluorescente amarilla, se realizó mutagénesis dirigida (YFP_{A206K}; Zacharias y col., 2002) sobre los plásmidos de dicha serie.

A partir de estos plásmidos se amplificaron las fusiones anteriormente mencionadas mediante PCR (*Pfu* DNA polimerasa). En el caso de la serie amarilla, los oligonucleótidos se fosforilaron (T4 PNK) antes de efectuar la PCR para ligar posteriormente con mayor eficacia los productos con extremos romos. El vector utilizado para la serie amarilla fue el plásmido pACYC184 (4.2 Kb) con 10-12 copias por célula y resistencias a cloranfenicol y tetraciclina. El vector fue digerido con las enzimas EcoRV y PshAI, purificando después el fragmento de 2.6 Kb que contenía el origen de replicación y el gen de resistencia a cloranfenicol. Dicho fragmento fue desfosforilado (Fosfatasa Antártica, Roche) para evitar la formación de religados.

Para la construcción de la serie roja, se empleó el plásmido pSEVA121 (*Standard European Vector Architecture*; cedido por el laboratorio del Dr. Victor de Lorenzo, (CNB-CSIC; Silva-Rocha y col., 2013), de bajo número de copias (4-6 por célula) y codificante de resistencia a ampicilina. Éste fue digerido con las enzimas de restricción SpeI y EcoRI, al igual que los productos de PCR correspondientes a la serie roja: *P_{tac}-His₆-RepA-WH1(WT)-mRFP-*opsp*₁₈*; *P_{tac}-His₆-RepA-WH1(A31V)-mRFP-*opsp*₁₈*; *P_{tac}-His₆-mRFP-*opsp*₁₈*; *P_{tac}-His₆-RepA-WH1(ΔN37)-mRFP-*opsp*₁₈*. Posteriormente, se ligaron los fragmentos amplificados (T4 DNA ligasa, Promega) con los vectores de cada una de las dos series.

Por último, se clonó en ambas series el gen del represor *lacI^q*, amplificándolo mediante PCR (*Pfu* DNA polimerasa). Para la serie amarilla, tanto los vectores derivados de pACYC184 (que portaban las fusiones de la serie amarilla) como el producto de amplificación, fueron digeridos con las enzimas de restricción SacI y KpnI, ligándose posteriormente los fragmentos (T4 DNA ligasa, Promega), generándose así la serie de plásmidos p15a: p15a-WH1(WT)-YFP, p15a-WH1(A31V)-YFP, p15a-YFP, p15a-WH1(ΔN37)-YFP. En el caso de la serie roja, tanto el producto de amplificación del gen del represor *LacI^q*, como los vectores derivados de pSEVA121 fueron digeridos con las enzimas de restricción KpnI y EcoRI, ligándose posteriormente los fragmentos (T4 DNA ligasa, Promega), generando así la serie de plásmidos pRK2: pRK2-WH1(WT)-mRFP, pRK2-WH1(A31V)-mRFP, pRK2-mRFP y pRK2-WH1(ΔN37)-mRFP; (Molina-García y Giraldo, 2014) (Tabla 3).

Una vez que las construcciones fueron verificadas, tanto por restricción como mediante secuenciación automática (*Secugen*), se aisló el DNA plásmidico (*High pure plasmid isolation kit, Roche*) y se cotransformaron células *E. coli* MDS42 con ambas series de plásmidos (pRK2 y p15a) en todas las combinaciones posibles de los mismos.

1.3.2. Construcción de las quimeras WH1(R1-4)-RF1

Se amplificó el gen *prfA* a partir del plásmido pELI02 (Tabla 3) (Diago-Navarro y col., 2009), sobre el cual se había eliminado previamente, mediante mutagénesis dirigida, la diana PvuI interna en *prfA*, sin alterar la secuencia de la proteína codificada, RF1, utilizando los oligonucleótidos que se indican en la Tabla 4. En el caso del extremo 5', además del sitio SacII, necesario para la clonación del fragmento *prfA* amplificado, se incluyeron a continuación las dianas SmaI y PvuI necesarias para la introducción posterior de las repeticiones en tándem del péptido amiloidogénico de RepA-WH1(A31V) (L₂₆VLCVSLI₃₄; Giraldo, 2007). Como vector se utilizó el pRG-SD1 (construido en el laboratorio por la Dra. Moreno del Álamo), que porta una secuencia de inicio de traducción subóptima (5pb entre la secuencia Shine-Dalgarno y el codón ATG iniciador)[‡], y expresa proteínas de fusión a seis histidinas bajo el control del promotor P_{tac}, inducible por IPTG. Dicho vector fue digerido con las dianas SacII y BamHI, lo que mantiene la etiqueta His6 N-terminal. Se ligó el fragmento amplificado, previamente digerido con las mismas enzimas, con el vector para obtener el pRG-WH1(R0)-RF1 (Tabla 3). A partir de este plásmido, se amplificó el módulo Ptac-His6-WH1(R0)-RF1 con extremos SpeI (5') y BamHI (3') (Tabla 4) y se clonó en un plásmido con el origen de replicación RK2, obteniéndose el pRK2-WH1(R0)-RF1.

Para la construcción del resto de quimeras, se insertó un fragmento de ADN espaciador codificador de media repetición del péptido amiloidogénico de RepA-WH1(A31V) con extremos SmaI (5') PvuI (3') (Figura 15A). Dada la dificultad intrínseca a la amplificación de secuencias repetidas por PCR, se obtuvieron los insertos con las repeticiones en tándem del péptido amiloidogénico mediante digestión enzimática (SmaI, EcoRV) y posterior extracción de gel de poliacrilamida (10%) de los plásmidos pUKC1620 R1-R4 (Gasset-Rosa y Giraldo, 2015), y se ligaron con el pRG-WH1(R0)-RF1 digerido con SmaI, generándose así los plásmidos pRG-WH1(R1-4)-RF1 (Figura 15B). Finalmente, y de nuevo

[‡] Únicamente se obtuvieron transformantes al utilizar el vector pRG-SD1. Vectores pRG con secuencias de inicio de la traducción óptimas resultaron tóxicas para *E. coli Fusion Blue* y MDS42, debido a los mayores niveles de RF1.

por medio de digestión enzimática, se extrajeron de los plásmidos pRG los insertos SmaI-BamHI que contenían las repeticiones R1, R2, R3 y R4 del péptido amiloidogénico de RepA fusionadas al gen *prfA* y se ligaron con el vector pRK2-WH1(R0)-RF1 digerido con SmaI y BamHI, generándose así la serie de vectores pRK2-WH1(R1-4)-RF1.

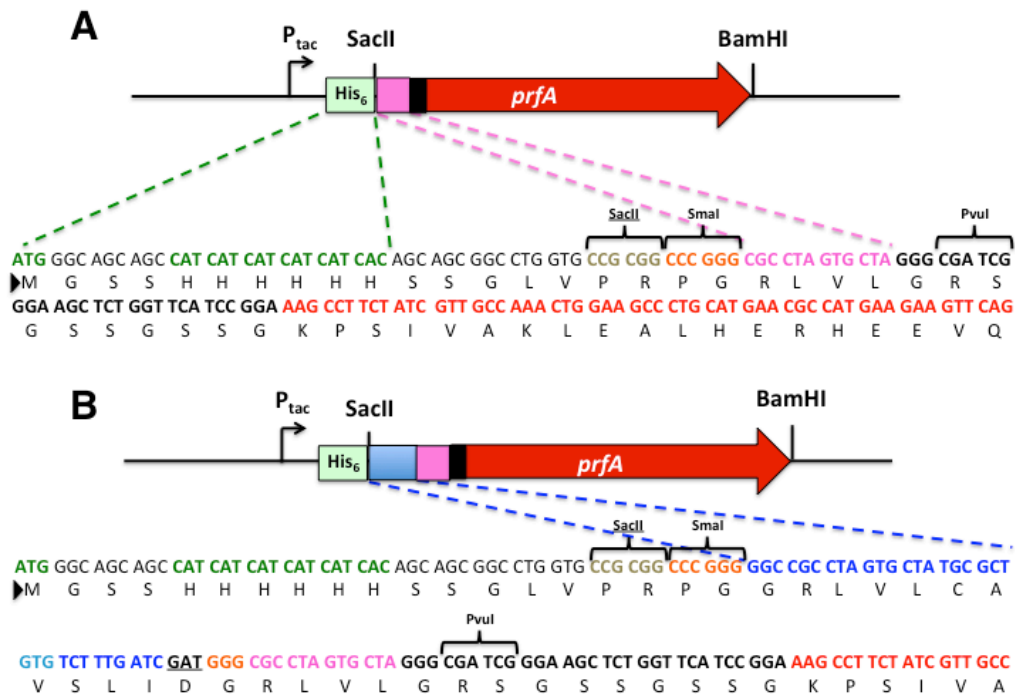


Figura 15: (A) Esquema de la construcción de las quimeras WH1(R0-4)-RF1. Tras clonar el gen *prfA* en el vector pRG con dianas *SacII* (5') y *BamHI* (3') junto con un espaciador en el extremo 5' rico en glicinas y serinas (en negro, (GSS)₂G) descrito en Fernández-Tresguerres y col., 2010, se insertó otro espaciador con media repetición de la secuencia amiloidogénica de RepA (GRLVLGR, en rosa) utilizando la diana *SmaI*. (B) A continuación, y utilizando de nuevo la diana *SmaI*, se clonaron las repeticiones en tándem obtenidas por restricción a partir de los vectores pUKCs. En el ejemplo se muestra en azul oscuro una de tales repeticiones (GRLVLCVSLI). En azul claro se representa la mutación hiperamiloidogénica A31V. En verde se muestra el codón de iniciación y la etiqueta de 6 histidinas del extremo 5'.

1.3.3. Construcción de los vectores pFus-*lacZ*(WT/ámbar)

Se amplificó el gen *lacZ* a partir del plásmido pMLM132 (cedido por el laboratorio del Dr. Díaz-Orejas; Santos-Sierra y col., 2003) utilizando nucleótidos específicos con extremos *SpeI* (5') y *SmaI* (3'). Se digirieron tanto el producto de PCR como el vector pFus (Lobato-Márquez y col., 2015), un derivado de pBR322, con dichas enzimas y se ligaron ambos fragmentos construyéndose así el plásmido pFus-*lacZ*-WT, que portaba el gen *lacZ* bajo el control del promotor P_{ARA} inducible por arabinosa.

Para la generación del plásmido pFus-*lacZ*-ámbar se realizó mutagénesis dirigida sobre éste utilizando Pfu Turbo (*Stratagene*) y oligonucleótidos específicos para introducir un codón de terminación ambar (UAG) prematuro en la posición A515 del gen *lacZ* (A515*) (Herring y col., 2003).

1.3.4. Construcción de la estirpe MRA8 Δ *lacZ*

Se siguió el protocolo descrito por Datsenko y Wanner, 2000; Maisonneuve y col., 2011. A partir de un cultivo de *E. coli* MRA8 previamente transformado con el plásmido pKD46 (Tabla 3), crecido durante 16h a 30°C en medio líquido (LB suplementado con ampicilina 50 µg/ml), se inoculó un cultivo fresco de 2 ml (LB ampicilina 50 µg/ml) que se incubó durante 3h a 30°C y 1100 rpm (*Thermo mixer compact*). Posteriormente, se indujo la expresión de la recombinasa del fago λ (λ rec) codificada en pKD46, añadiendo 0,2% de arabinosa y se creció durante 2h en las mismas condiciones. Las células se centrifugaron 2 minutos a 11000 rpm y 4°C, y se les realizaron dos lavados, uno con H₂O y otro con 10% glicerol estéril. Tras el segundo lavado, se resuspendieron en 20-30µl de glicerol 10% estéril y se transfirieron a una cubeta de electroporación (*BioRad* de 0.2 cm de distancia entre electrodos) a la cual se añadió el producto de PCR. Éste contenía el módulo Km-*parE* con extremos de 50pb homólogos de los extremos 5' y 3' del gen *lacZ* (Figura 16A). En un electroporador (*MicroPulser, BioRad*) se programó el micropulso "Ec2" (2.5kV). Tras la electroporación, se recuperaron las células creciéndolas durante 3h a 30°C y 1100 rpm, y se sembraron en placas de LB agar suplementadas con kanamicina (50 µg/ml). Así se generó la estirpe MRA8 Δ *lacZ*::Km-*parE*. Sobre ésta, se amplificaron por separado mediante PCR dos regiones de 500 pb cada una flanqueantes al gen *lacZ*. Ambos fragmentos se ligaron y se amplificó el producto de la ligación, generando un fragmento de 1kpb que contenía fusionadas las regiones del genoma de *E. coli* anteriores y posteriores al gen *lacZ* (Figura 16B). De esta manera, se realizó un segundo paso de recombinación en la estirpe MRA8 Δ *lacZ*::Km-*parE*, previamente transformada con el plásmido pKD46, siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente pero electroporando con el fragmento de 1kpb (Figura 16C). Para seleccionar las células recombinantes, se plaqueó en M9 agar suplementado con ramnosa (0,5%). La ramnosa induce la toxina ParE, luego únicamente aquellas células que hubiesen perdido el módulo Km-*parE* crecerían en esas condiciones, generando la estirpe MRA8 Δ *lacZ*.

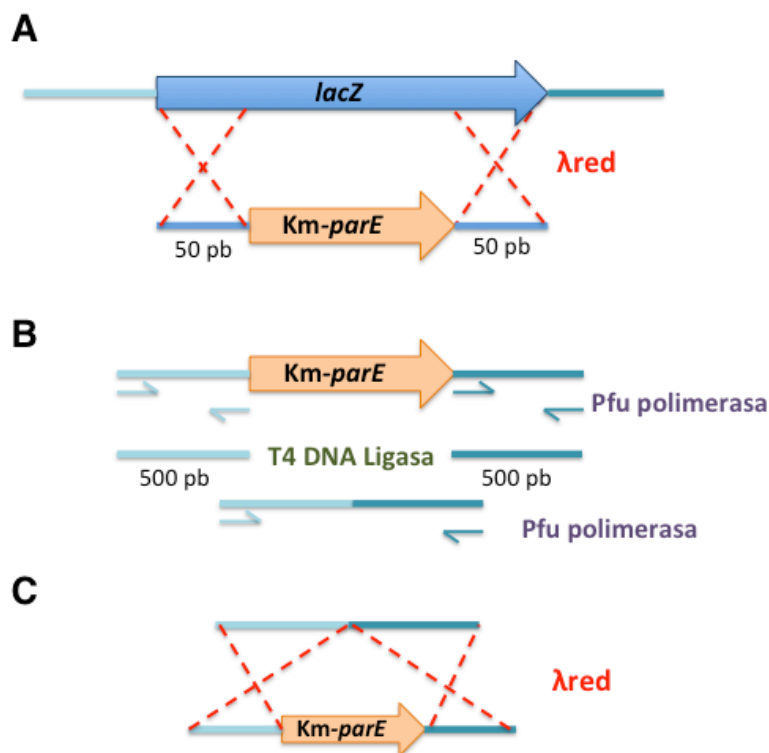


Figura 16: Construcción de la estirpe MRA8 $\Delta lacZ$. Se realizaron dos pasos de recombinación homóloga: el primero con el módulo *Km-parE* flanqueado por los extremos 5' y 3' del gen *lacZ* (A), y el segundo con la fusión de las regiones flanqueantes al gen *lacZ* (B y C).

2. Métodos relativos a la coagregación de variantes de RepA-WH1

2.1. Crecimiento y fijación de bacterias

Todos los experimentos se llevaron a cabo en células de *E.coli* MDS42 *recA*⁻, que carece de elementos genéticos móviles que pudieran inactivar las fusiones entre RepA-WH1 y mCherry/YFP por inserción de transposones como se observó en Fernández-Tresguerres y col., 2010. Una vez cotransformadas con las distintas combinaciones de plásmidos de las series roja y amarilla (Tabla 3), se crecieron las células hasta alcanzar una densidad óptica a 600nm de 0,2, momento en el cual se indujo la expresión de las proteínas de fusión con 0,5mM de IPTG, y se fijaron alícuotas de 1ml de células con paraformaldehído al 4% (v/v) cada hora hasta 4h post-inducción.

2.2. Microscopía de epifluorescencia

Las bacterias que expresaban las distintas proteínas de fusión WH1-WT/A31V/ Δ N37-mRFP/YFP una vez fijadas, se observaron utilizando un microscopio Nikon Eclipse 90i equipado con un objetivo de aceite de inmersión CFI Plan APO VC X 100 y una cámara CCD ORCA-R². Para la visualización se emplearon los siguientes filtros de excitación (EX) y emisión (EM) y tiempos de exposición: para la serie roja, EX a 543/22nm, EM a 593/40nm y 600ms de tiempo de exposición; para la serie amarilla, EX a 500/24nm, EM 542/27nm y 700ms de tiempo de exposición. Para los experimentos de co-expresión, el tiempo de exposición se fijó en 1s para ambos canales. Además, se interpuso en la vía óptica un filtro neutro ND 1/8, en todos los casos salvo aquellos casos en los que se co-expresaban los controles mRFP e YFP en los que se utilizó un filtro ND 1/32 debido a los elevados niveles de expresión de estas construcciones. Asimismo, se adquirieron imágenes de contraste interferométrico diferencial (DIC) (100-300ms de exposición). El análisis de las imágenes se llevó a cabo utilizando el programa NIS AR 3.1. (Nikon).

2.3. Detección y cuantificación de proteínas: *Western-blot* y *SDD-AGE*

Los niveles de expresión de las proteínas de fusión WH1-WT/A31V/ Δ N37-mRFP/YFP se determinaron mediante *Western-blot*, gracias a las secuencias de His6 y c-myc localizadas en el extremo N-terminal de las fusiones de las series roja y amarilla, respectivamente. Cuatro horas después de la inducción, se recogieron 25 ml de células a DO_{600nm}=0,2, se lisaron según Gasset-Rosa y col., 2014, y se separaron las fracciones soluble y agregada centrifugando el lisado 1h a 13000 rpm y 4°C. Tras cargar cantidades equivalentes de ambas fracciones en un gel de poliacrilamida al 12,5%, las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE (Laemmli, 1970) y se transfirieron a una membrana de PVDF (*BioRad*). Las cantidades de anticuerpo utilizadas fueron: para la serie roja anticuerpo primario producido en ratón α -His 1:50.000 (*Sigma*) y para la serie amarilla, anticuerpo primario producido en ratón α -c-myc 1:10.000 (*Sigma*). Como anticuerpo secundario, se empleó un α -ratón generado en cabra conjugado con peroxidasa de rábano 1:10.000 (*GE-Healthcare*). La detección se realizó utilizando el *kit* comercial *ECL-Prime* de *GE-Healthcare*. Para la cuantificación se densitometraron muestras de tres experimentos independientes empleando la aplicación *Quantity One* 4.6.3 de *BioRad*.

La formación de oligómeros de carácter amiloide resistentes a SDS se determinó igualmente tras 4h post-inducción, mediante electroforesis en gel de agarosa en condiciones semi-desnaturalizantes en presencia de detergente (SDD-AGE), según se describe en Molina-García y Giraldo, 2014; Molina-García y Gasset-Rosa, 2014.

3. Métodos relativos a las aproximaciones “ómicas” para la caracterización de la toxicidad del prionoide RepA-WH1(A31V) en *E. coli*

3.1. Crecimiento bacteriano

Para todos los ensayos fisiológicos, las proteínas de fusión RepA-WH1(A31V)-mRFP o RepA-WH1(Δ N37)-mRFP se expresaron en células de *E. coli* MDS42 *recA*⁻. Para ello, se crecieron en placas de LB con ampicilina (100 μ g/ml) a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente, estas células crecidas en placa se inocularon en medio líquido (LB con ampicilina) y se crecieron hasta D.O_{600nm} de 0,2, momento en el cual se indujo la expresión de RepA-WH1(A31V)-mRFP o RepA-WH1(Δ N37)-mRFP con 0,5mM de IPTG.

3.2. Extracción del ARN

Este ensayo se realizó en células de *E. coli* MDS42 que expresaban WH1(A31V)-mRFP o WH1(Δ N37)-mRFP, crecidas como se indica en el apartado 3.1. Se recogieron 2-3x 10⁹ células de tres réplicas biológicas independientes a tiempos 30 min, 1, y 2,5 horas después de la inducción y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido, transfiriéndose después a -70°C. Para la extracción del ARN, se utilizó el *kit* comercial *RNeasy* de *Quiagen*, incluyendo un paso adicional de digestión con *RNA-free DNAsI* (10 μ l, 2h a 37°C). La pureza del ARN extraído se verificó primero en un gel de agarosa 0,8% en TAE 1X tras incubarse, (v/v) durante 2 minutos a 95°C, con una solución de formamida: 94% (v/v) formamida desionizada, 17mM EDTA, 0,025% (p/v) xilencianol y 0,025% (p/v) azul de bromofenol. Las muestras se analizaron después mediante electroforesis microfluídica en el *Bioanalyzer 2100 RNA chip* (*Agilent*) en el servicio de la Unidad de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid.

3.3. Análisis transcriptómico de la respuesta de *E. coli* al prionoide RepA-WH1

Tanto el marcaje de las sondas, como la hibridación de los *microchips* de ARN (*Affymetrix*) se llevó a cabo en la Unidad de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid. Las muestras de ARN fueron retro-transcritas a ADN utilizando como cebadores hexámeros de oligonucleótidos de secuencia aleatoria. El ARN molde fue degradado mediante tratamiento con NaOH. El ADNc obtenido tras el proceso de retrotranscripción, se marcó utilizando TdT ADN polimerasa y ddUTP-biotina. El ADNc así preparado, se hibridó con el *GenChip E. coli Genome 2.0 arrays (Affymetrix)*, compuesto por 10.000 secuencias pertenecientes al pangenoma de cuatro estirpes de *E. coli*, en la cámara Fluidics Station 400 (*Affymetrix*) a 45°C durante 16h. Seguidamente, los *microchips* se lavaron y tiñieron, digitalizándose la emisión de fluorescencia con el *GenChip Scanner 3000 7G (Affymetrix)*, según el protocolo descrito por el fabricante. Los *microchips* de las tres réplicas biológicas de cada uno de los mutantes (A31V y Δ N37) se procesaron de manera idéntica. Los datos se analizaron utilizando el *software Babelomics* (Medina y col., 2010). Para el análisis estadístico se utilizó el test de la t de Student: se consideraron como diferencialmente sobreexpresados/reprimidos de manera significativa, aquellos genes cuyos valores-p y FDR fueron inferiores a 0,05 ($p < 0,05$; $FDR < 0,05$). Además los datos se filtraron manualmente para eliminar genes con baja señal (ruido) que no estaban presentes en el genoma de la cepa utilizada en el análisis, MDS42 (Pósfai y col., 2006). Al analizar los datos se consideraron únicamente aquellos genes que presentasen diferencias del doble o más del doble de expresión. Así, los genes cuyas razones de señal A31V/ Δ N37 fueron superiores a 2 o inferiores a 0,5 se seleccionaron como la fracción del genoma de *E. coli* que preferencialmente se sobreexpresa o se reprime, respectivamente, en respuesta a la amiloidosis producida por el prionoide RepA-WH1(A31V).

3.4. Análisis proteómico de la fracción insoluble purificada

A partir de células MDS42, expresando o no WH1(A31V)-mRFP o WH1(Δ N37)-mRFP, crecidas 16h a 37°C en placas de LB con ampicilina, se inocularon cultivos en medio líquido que se dejaron crecer hasta DO_{600nm} de 0,2; momento en el cual se indujo la expresión de A31V-mRFP o Δ N37-mRFP con 0,5mM de IPTG. Tras la inducción, se recogieron 13 unidades de absorbancia (DO_{600nm}) a tiempos 30 min, 1h y 2,5h. Se lisaron

las células con 1,5 ml de tampón I (20mM HEPES pH 6,0; 0,1M NaCl; 0,5% sulfobetaína 12 (SB-12); 0,5% deoxicolato sódico (Na-DOC); 1mM EDTA; 50 µg/ml de RNasa A; inhibidores de proteasas (*Roche*)) y se dejó toda la noche a -70°C. Al día siguiente se centrifugó el lisado a 12000 rpm durante 1h a 4°C. Se desechó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 1,5ml de tampón II (20mM HEPES pH 6,0; 1M NaCl; 0,5% SB-12; 0,5% Na-DOC; 1mM EDTA; inhibidores de proteasas, *Roche*). Las muestras se sonicaron durante 30s (vástago, *Branson*) y se centrifugaron a 12000 rpm durante 1h a 4°C. Tras descartar de nuevo el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 250µl de tampón III (20mM HEPES pH6,0; 0,1M NaCl; 1mM EDTA) y se sonicó (vástago, *Branson*) durante 30s. El lisado se centrifugó a continuación durante toda la noche a 12000rpm a 4°C en un gradiente discontinuo de sacarosa (20%, 40%). Al día siguiente, se retiró con cuidado el sobrenadante, se resuspendió el sedimento en tampón de carga de Laemmli (2x) y se separaron las proteínas en un gel de poliacrilamida al 10%. Se llevó a cabo la electroforesis (SDS-PAGE) y tras tinción con azul de Coomassie se procesaron las proteínas totales presentes en cada calle mediante espectrometría de masas en el servicio de proteómica del CIB-CSIC, analizándose por trampa iónica. Se realizaron 3 réplicas biológicas. Para ello, tras desteñir los geles se cortaron las bandas situadas por encima y por debajo de las bandas características pertenecientes a RepA-WH1(A31V) y RepA-WH1(ΔN37). Todas ellas fueron digeridas durante toda la noche sobre el gel (50mM NH₄HCO₃, 12,5µg/ml tripsina bovina a 30°C). Los péptidos se extrajeron con acetonitrilo (ACN) y 0,5% ácido trifluoroacético, se limpiaron utilizando la matriz C18 *ZipTip*, se resuspendieron en tampón A (0,1% ácido fórmico, 2% ACN) y se procesaron como se describe en (Barderas y col., 2013). Brevemente, los péptidos fueron atrapados en la columna C18-A1 *ASY-Column* (*Thermo Scientific*), eluidos y cargados en la columna *Biosphere C18* (*NanoSeparations*). Las muestras se sometieron a un gradiente de 125 min (300 nL/min) desde 0 a 35% de tampón B (0,1% ácido fórmico en 100% ACN), seguido de 15 min a 45% y 10min a 95% de tampón B, en el *NanoEasy HPLC* (*Proxeon*) acoplado a la fuente de iones de nanoelectrospray (*Proxeon*). El espectro de masas se adquirió utilizando el *LTQ-Orbitrap Velos MS* (*Thermo Scientific*) en el modo de ión positivo. El espectro total de masas (m/z 400-1200) se adquirió con un valor de 1.000.000 a una resolución de 60.000 con m/z de 400. Así, los 15 iones mas intensos se seleccionaron para su fragmentación inducida por colisión en la trampa iónica con un valor diana de 10.000 y una energía de colisión normalizada del 35%. Las masas se procesaron utilizando el

motor de búsqueda SEQUEST (Eng y col., 1994), que los enfrentó a la base de datos del proteoma de *E. coli* MDS42 (Uniprot). Los péptidos se validaron utilizando el algoritmo Percolator (Spivak y col., 2009) aceptándose únicamente aquellos cuyo nivel de confianza era alto para descartar falsos positivos (≥ 3 péptidos identificados o PSM (*peptide spectrum match*) $\geq n^{\circ}$ de péptidos identificados en cuyo caso el valor de XCorr debe ser mayor >3). Por último las proteínas clasificadas como coagregadas con $\Delta N37$, se sustrajeron, si estaban presentes, de las coagregadas con RepA-WH1(A31V) identificándose así la fracción del proteoma de *E. coli* que específicamente agrega con el prionoide RepA-WH1(A31V).

3.5. Comparación de análisis transcriptómico y proteómico

La lista de genes preferencialmente sobreexpresados/reprimidos o las proteínas coagregadas con RepA-WH1(A31V) pero no con la variante $\Delta N37$, se procesaron en paralelo de manera similar, incluyendo un análisis mediante algebra Booleana y su representación en diagrama de Venn (Oliveros, 2007). Así se clasificaron los genes (o proteínas) a tiempos cortos si solo estaban presentes a 30 min o en 30 min y 1h, a tiempos medios si únicamente estaban presentes a 1h, y a tiempos largos si estaban presentes a 1h y 2,5h o únicamente a 2,5h. La clasificación funcional de *Gene ontology* (GO) se realizó por medio de la base de datos *EcoCyc* (Keseler y col., 2013). Los datos transcriptómicos y proteómicos se cruzaron para obtener un set mínimo de rutas funcionales y conjuntos de proteínas implicados en la amiloidosis de RepA-WH1(A31V) utilizando el paquete informático *STRING 9.1* (Franceschini y col., 2013).

3.6. Valoración de los niveles de hierro. Ensayo de ferrocina

Se siguió el protocolo descrito por Honn y col., 2012, basado en la capacidad de la ferrocina para formar un complejo que absorbe a 562nm con el hierro (Fe^{2+}).

Este ensayo se realizó en células de *E. coli* MDS42 crecidas como se indica en el apartado 3.1. Tras la inducción, se recogió una unidad de DO_{600nm} cada 30 minutos. Las células se centrifugaron, se recogió el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en PBS (1x).

Para valorar la cantidad de hierro intracelular, se lisaron las células presentes en el sedimento con 100 μ l de 50mM NaOH, deteniendo la lisis posteriormente con 100 μ l de 10mM HCl. Para liberar el hierro unido a proteínas, se trataron los lisados con 100 μ l de

solución desacoplante (0,7M HCl, 2,25% p/v KMnO₄) 2h a 60°C. A continuación, las muestras se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente con 100µl de reactivo de detección de hierro (Fe²⁺) (6,5mM ferrocina, 6,5mM neocuproina, 2,5 M acetato amónico, 1M ácido ascórbico), y se centrifugaron 30 segundos a máxima velocidad para eliminar las partículas insolubles. Para valorar la cantidad de hierro extracelular, se incubaron 30µl de los sobrenadantes del cultivo con 170µl de reactivo de detección de hierro durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se midió la absorbancia a 562nm de todas las muestras.

3.7. Transporte dependiente de H⁺: Incorporación de gentamicina

Este ensayo se realizó en células de *E. coli* MDS42 crecidas como se indica en el apartado 3.1. Tras 30 minutos de inducción se les añadió gentamicina 9µg/ml, y se midió la densidad óptica a 600nm de los cultivos cada 30 minutos durante 5 horas. Además, se realizaron los controles correspondientes sin gentamicina para comparar el efecto del antibiótico en el crecimiento de las células que expresaban RepA-WH1(A31V)-mRFP o RepA-WH1(ΔN37)-mRFP.

3.8. Valoración de la respiración aerobia: Consumo de oxígeno

Se partió de células de *E. coli* MDS42, expresando o no WH1(A31V)-mCherry o WH1(ΔN37)-mCherry, crecidas como se indica en el apartado 3.1. Tras la inducción, se valoró el consumo de O₂ en intervalos de 30 min durante 5 h utilizando un electrodo de platino de tipo Clark (*Hansa-Tech*) (Prieto y col., 1995; Alonso-Monge y col., 2009). En este tipo de electrodos, las muestras biológicas se introducen en una cámara termostalizada con un electrodo de oxígeno insertado y acoplado a agitación magnética. Además presenta un cátodo de platino que rodea a un ánodo cilíndrico central de plata ambos conectados mediante un electrolito (solución saturada al 50% en KCl) (Silva y Oliveira 2012). Este electrodo determina la concentración de O₂ en soluciones acuosas a lo largo del tiempo. Dicha valoración es indirecta, y se basa en relacionar la saturación de oxígeno (217nmol O₂/ml) a una temperatura dada (37°C) con la recta que representa el electrodo (180 mm). De esta manera, de las variaciones de la pendiente en mm, se puede inferir el consumo de O₂ en nmol/ml y expresarlo en nmol O₂/10⁶ células teniendo en cuenta la densidad óptica del cultivo en cada medida.

3.9. Sensibilidad a especies reactivas de oxígeno (ROS)

3.9.1. H₂O₂ y paraquat (O₂⁻)

A partir de células MDS42, expresando RepA-WH1(A31V)-mRFP, RepA-WH1(Δ N37)-mRFP, o únicamente mRFP, crecidas 16 h a 37°C en placas de LB con ampicilina, se inocularon cultivos líquidos que se dejaron crecer hasta una DO_{600nm} de 0,4; momento en el que se plaquearon 400µl en LB-agar con ampicilina y 0,5mM IPTG (para inducir la expresión de las distintas variantes de RepA-WH1-mRFP). Se colocaron filtros de papel *Whatman* impregnados con 0,001% (v/v) de H₂O₂ ó 0,0025% de paraquat (p/v) y se dejaron crecer durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente se tomaron fotografías y se realizaron medidas de los radios de los halos de inhibición del crecimiento y se calculó el área de los mismos. En el caso del H₂O₂, se repitió el experimento en presencia de 1,5mM de ascorbato añadido en las placas.

3.9.2. Hyper-3

La estirpe MDS42, expresando o no RepA-WH1(A31V)-mRFP o RepA-WH1(Δ N37)-mRFP, se transformó con el plásmido PC1 (Hyper-3) (Bilan y col., 2013). Se crecieron en placas de LB con ampicilina (100µg/ml) y cloranfenicol (30µg/ml) durante toda la noche a 37°C y se inocularon en medio líquido, donde se dejaron crecer hasta DO_{600nm}=0,2; momento en el que se indujo la expresión de RepA-WH1(A31V) o RepA-WH1(Δ N37) añadiendo 0,5mM de IPTG. Se recogieron células cada 30 min y se fijaron con 4% (p/v) paraformaldehído en PBS (1x). Se observaron las preparaciones al microscopio de epifluorescencia exponiendo 5 s para el canal amarillo (YFP) y 100ms para el canal rojo (TRICT).

3.10. Valoración de los niveles de ATP

Se partió de células de *E. coli* MDS42, expresando o no RepA-WH1(A31V)-mCherry o RepA-WH1(Δ N37)-mCherry, crecidas como se indica en el apartado 3.1. Tras la inducción, se midieron los niveles de ATP intracelular de 4 x 10⁸ células cada 30 minutos durante 4 horas utilizando el kit comercial *ATP Bioluminescence assay HS II (Roche)*. Éste se basa en la dependencia de ATP de la enzima luciferasa para catalizar la oxidación de su sustrato que resulta en emisión de luz.

4. Métodos relativos al prionoide quimera WH1(R1-4)-RF1.

4.1. Crecimiento bacteriano

Todos los ensayos se realizaron expresando las quimeras WH1(R1-4)-RF1 en células de *E. coli* MRA8 Δ lacZ (*prfA1^{ts}*) (Zhang y col., 1994), estirpe en la que el gen *prfA* que codifica para RF1 es soluble y funcional a 30°C, pero no a 42°C. Para ello se crecieron cultivos en medio líquido LB o M9+CAA suplementado con ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml) durante toda la noche a 30°C. Al día siguiente, se inocularon (1/100) en medio fresco y se dejaron crecer a 30°C hasta que alcanzaron una D.O_{600nm} de 0,3.

4.2. Ensayos de complementación del crecimiento en MRA8 Δ lacZ

Tras crecer los cultivos a 30°C (ver apartado 4.1.), se hicieron diluciones seriadas de los mismos (10⁻¹-10⁻⁵). A continuación, se inocularon 7 µl de cada dilución a modo de gota en placas de LB con ampicilina, kanamicina y, sólo en el caso de las placas que se crecerían a 42°C (para inducir el factor presente en las quimeras), distintas concentraciones de IPTG. Las placas se incubaron a 30°C y 42°C durante toda la noche para valorar la capacidad de crecimiento de las células MRA8 Δ lacZ (*prfA^{ts}*) expresando las distintas quimeras en presencia o ausencia del RF1 celular (30°C y 42°C, respectivamente).

4.3. Ensayos de lectura corrida de codones de terminación prematuros

Para los ensayos realizados en placas de agar, tras crecer los cultivos (ver apartado 4.1.), se hicieron diluciones seriadas de los mismos (10⁻¹-10⁻⁵). A continuación, se añadieron 7 µl de cada dilución a modo de gota en placas de LB con ampicilina (100µg/ml), kanamicina (50 µg/ml), IPTG (0,02mM), arabinosa (0,001%), glucosa (0,003%) y X-Gal (40 µg/ml) y se crecieron a 30°C y 42°C durante toda la noche para valorar la capacidad de lectura corrida de las distintas quimeras, que viene determinada por la aparición o no de colonias con coloración azul.

Para los ensayos en medio líquido, se utilizó M9-CAA, un medio carente de coloración. Se crecieron los distintos cultivos, tal y como se indica en el apartado 3.1, a 30°C hasta que alcanzaron una D.O_{600nm} de 0,3, momento en el que se añadieron 500 µl de cada cultivo a una placa multipocillo p24 (Falcon). Se suplementó cada pocillo con IPTG (0,02mM), arabinosa (0,001%), glucosa (0,003%) y X-Gal (40 µg/ml) y las placas se

crecieron a 42°C y 300rpm (*Thermo mixer compact eppendorf*) durante 24 h. En el caso de los ensayos con inhibidores de la amiloidosis (Figura 17), se siguió el mismo protocolo y se añadieron los inhibidores en la placa multipocillo: curcumina (50 µg/ml), quercetina (100 µg/ml), epigallocatequina-3-galato (100 µg/ml), resveratrol (100 µg/ml) y miricetina (37,5 µM), todos ellos a partir de un *stock* 25mM en DMSO.

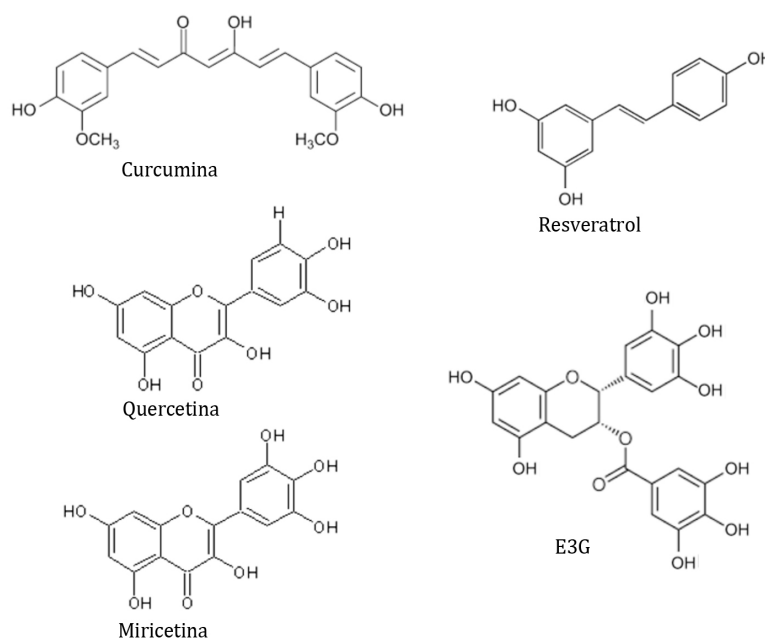


Figura 17: Fórmulas químicas de los compuestos polifenólicos utilizados en este trabajo. E3G: Epigallocatequina-3-galato

4.4. Ensayos de actividad β -galactosidasa

Tras crecer los cultivos a 30°C (ver apartado 4.1.), éstos se repartieron en 8 alícuotas y se indujo la expresión de la enzima β -galactosidasa (arabinosa 0,001%, glucosa 0,003%) y se dejaron crecer 4 de ellos a 30°C y otros 4 a 42°C en presencia de 0,02mM de IPTG. Se valoró la actividad β -galactosidasa, mediante colorimetría (degradación de ONPG) a 28°C, según el método descrito por Miller (1972), a las 3 y 6 h después de la inducción. Este método cuantifica la actividad β -galactosidasa utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades de Miller} = 1000 \times ((A_{420} - (1,75 \times A_{550})) / (t(\text{min}) \times V(\text{ml}) \times D \cdot O_{600}))^{\S}$$

^{\S} A_{420} : Absorción de los compuestos de degradación del ONPG; $(1,75 \times A_{550})$: factor de corrección dispersión de luz a 420nm.

Se realizaron al menos 3 experimentos independientes para cada quimera. Para los ensayos a 3 y 6h realizados en LB se utilizaron los siguientes volúmenes y tiempos de reacción: para las quimeras en combinación con el reportero *lacZ*-WT, se utilizaron 200µl de cultivo llevados a un volumen final de 1ml con tampón Z (Miller, 1972) y 5 minutos de reacción, mientras que en combinación con el reportero *lacZ*-ámbar se emplearon 8ml de células que se resuspendieron en 1ml de tampón Z y 15 minutos de reacción. En el caso de los ensayos en medio M9+CAA, se utilizaron 200 µl de cultivo y 5 minutos de reacción en las combinaciones con el *lacZ*-WT, y 300 µl de cultivo y 15 minutos de reacción en aquellas con el reportero *lacZ*-ámbar.

En el caso de las medidas de actividad de las células recuperadas de la placa multipocillo, la valoración se realizó a las 24 horas post-inducción, para correlacionarla con la aparición o no de coloración azul. Se realizaron 6 réplicas de cada experimento.

4.5. Detección de las quimeras: *Western-blot* y *SDD-AGE*

La determinación bioquímica de la síntesis de las proteínas de fusión WH1(R1-4)-RF1 se realizó mediante *Western-blot*, utilizando como epítipo la etiqueta His6 localizada en el extremo N-terminal de cada una de las quimeras, tras inducir su expresión 3h con 1mM de IPTG. Dada la tendencia de RF1 a formar complejos con las proteínas ribosomales (Janssen y Hayes, 2009; Moffat y col., 1993; Moffat y col., 1991; Pavlov y col., 1998) se llevó a cabo la electroforesis (SDS-PAGE) en un gel al 8% de poliacrilamida añadiendo en el tampón de carga 6M de urea tal y como describen Moffat y col., 1993. Se transfirió el gel a una membrana de PVDF mediante transferencia húmeda (Mini Trans-blot, *BioRad*). Para la detección por *Western-blot* se utilizó el anticuerpo α -His de Sigma (1/1000) y un anticuerpo secundario α -ratón (1/10.000).

La presencia de oligómeros de naturaleza amiloide resistentes a SDS se valoró mediante electroforesis en gel de agarosa en condiciones semidesnaturalizantes en presencia de detergente (SDD-AGE), como describen Molina-García y Giraldo (2014), Molina-García y Gasset-Rosa (2014).

V. RESULTADOS

1. Coagregación de variantes de RepA-WH1

1.1. La expresión de distintas variantes de RepA-WH1 da lugar a fenotipos diversos en *E. coli*

La variante silvestre (WT) del dominio WH1 de RepA, que es soluble y con bajo potencial amiloide, la variante hiperamiloidogénica WH1(A31V) y el mutante WH1(Δ N37), que carece de la secuencia amiloidogénica de RepA y agrega en forma de cuerpos de inclusión mono o bipolares (Gasset-Rosa y col., 2014), se clonaron tanto en un plásmido con replicón RK2 de bajo número de copias como en otro plásmido con origen de replicación p15A de número de copias intermedio, en ambos casos bajo el control del promotor P_{tac} . Estas variantes se fusionaron traduccionalmente, en su extremo C-terminal, mediante un espaciador flexible rico en glicinas y serinas (Fernández-Tresguerres y col., 2010), a la proteína roja fluorescente monomérica mCherry (mRFP) o a la proteína amarilla fluorescente (YFP). En esta última se mutó la alanina del residuo 206 por lisina, para obtener una variante esencialmente monomérica de la misma (Zacharias y col., 2002). Además, en el extremo N-terminal de las proteínas de fusión se clonó una etiqueta de 6 histidinas o una etiqueta c-myc (para las fusiones a mRFP e YFP respectivamente), con objeto de poder identificarlas mediante *Western-blot*. A continuación de las proteínas de fusión, se clonó un módulo con 18 repeticiones de la secuencia de ADN que induce de manera específica la amiloidogénesis en RepA-WH1 (*opsp₁₈*) y una copia del gen *lacI^q*, que codifica al represor del promotor P_{tac} .

Al inducir de manera independiente, mediante la adición de IPTG, células de *E. coli* MDS42 transformadas con los distintos plásmidos arriba indicados, se obtuvieron fenotipos distintos para cada variante con independencia de la proteína fluorescente empleada, como se había descrito previamente (Fernández-Tresguerres y col., 2010; Gasset-Rosa y col., 2014). La variante WH1(WT) presentó fluorescencia soluble difusa a lo largo del citoplasma de la célula, al igual que las proteínas fluorescentes (mRFP e YFP), expresadas sin fusionar como control (Figura 18A). Sin embargo, las variantes WH1(A31V) y WH1(Δ N37) aparecían agregadas en el citoplasma aunque presentaron fenotipos distintos: la primera agregaba en forma de múltiples inclusiones, principalmente 2 ó 3, distribuidas a lo largo del citoplasma de la célula, mientras que la segunda lo hacía en forma de cuerpos de inclusión mono o bipolares.

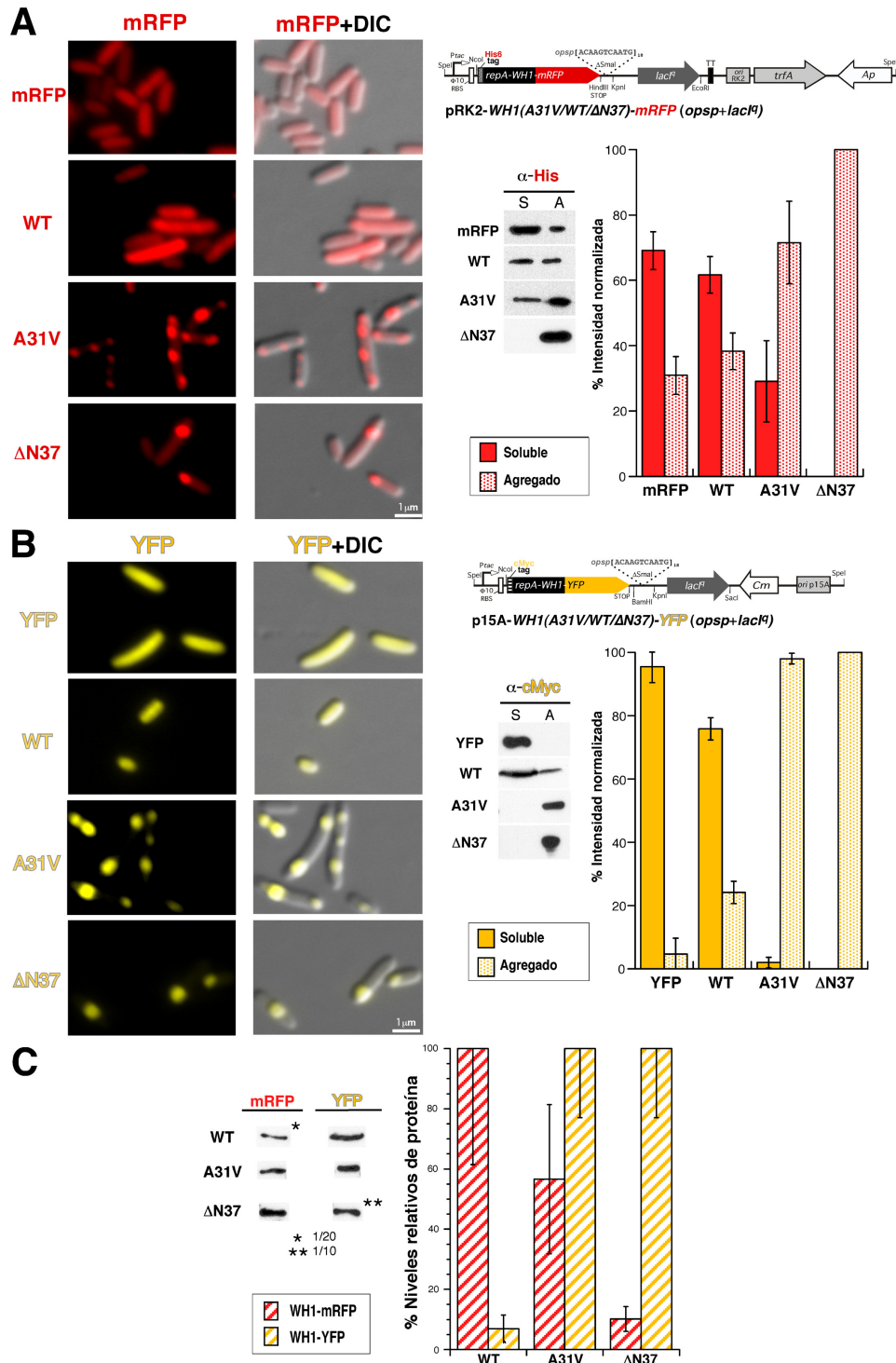


Figura 18: Expresión en *E. coli* MDS42 de las variantes de RepA-WH1(wt, A31V y Δ N37) fusionadas a mCherry/mRFP (A) o YFP (B). Los paneles de la izquierda muestran imágenes de microscopía (fluorescencia y DIC) de células representativas y los de la derecha esquemas lineales de los plásmidos empleados para la expresión de las proteínas de fusión. Los geles corresponden a *Western-blots* realizados sobre lisados de las mismas células tras someterlos a sedimentación y posterior cuantificación (histogramas). (C) Determinación, a partir de los *Western-blots* del mismo número de células, de los niveles relativos de expresión de las distintas variantes de RepA-WH1, expresadas a partir de los vectores RK2 (mRFP) o p15A (YFP). En todos los paneles los histogramas representan la intensidad media obtenida de al menos tres experimentos independientes. Los asteriscos (*) muestran los factores de dilución aplicados en muestras con altos niveles de expresión para evitar la saturación de cara a su cuantificación. Sobre cada barra de los histogramas se representa su desviación estándar. RBS, sitio de unión del ribosoma. α , anti. (Molina-García y Giraldo., 2014).

Los niveles relativos de proteína presentes en las fracciones soluble (S) y agregada (A) se determinaron mediante *Western-blot* utilizando anticuerpos monoclonales específicos (α -His y α -c-myc) (Figura 18, A y B, derecha). La cantidad de proteína WH1(WT) soluble detectada fue mayor cuando se expresó fusionada a YFP (Figura 18B) que tras fusionarla a mRFP (Figura 18A), además de que en este último caso se detectó una considerable fracción agregada. Este resultado concuerda con un mayor nivel de expresión de la proteína WH1(WT), y por tanto una mayor tendencia a la agregación, cuando se expresa desde el vector RK2 (Figura 18C). Sin embargo, las variantes WH1(A31V) y WH1(Δ N37), se encontraron ambas en su mayoría agregadas, independientemente del vector o de la proteína fluorescente de fusión empleados (Molina-García y Giraldo, 2014).

1.2. Coexpresión de las variantes RepA-WH1 (WT, A31V y Δ N37): Nucleación condicionada de la variante WH1(WT)

Con objeto de explorar el potencial de RepA-WH1 para moldear *in vivo* su conformación amiloide sobre distintas formas mutantes de la proteína, y tras establecer las condiciones de expresión para las proteínas individuales, se coexpresaron éstas a pares, en todas las combinaciones posibles, en células de *E. coli* MDS42. Únicamente se observó fluorescencia difusa en aquellas células en las que se coexpresó la variante WH1(WT) fusionada a ambos reporteros fluorescentes (mRFP/YFP). Sin embargo, las variantes con tendencia a agregar (A31V y Δ N37) dominaban sobre la WT induciendo la agregación de ésta siguiendo el patrón característico de la variante con la que se coexpresó: bien en forma de agregados múltiples y dispersos al expresarla con WH1(A31V), o bien en forma de cuerpos de inclusión mono o bipolares al hacerlo con WH1(Δ N37), siendo A31V la variante más fuerte, independientemente de sus niveles de expresión. (Figura 19A y B) (Tabla 5) (Molina-García y Giraldo, 2014). Además, la longitud celular media de las bacterias que expresaban los distintos pares de variantes RepA-WH1 aumentaba en al menos 1 μ m para aquellas que expresaban la variante A31V (Tabla 5).

Las posibles diferencias entre las fracciones agregadas de las variantes WH1(A31V) y WH1(WT) se determinaron mediante electroforesis en gel de agarosa en condiciones semi-desnaturalizantes en presencia de detergente (SDD-AGE) (Figura 19C).

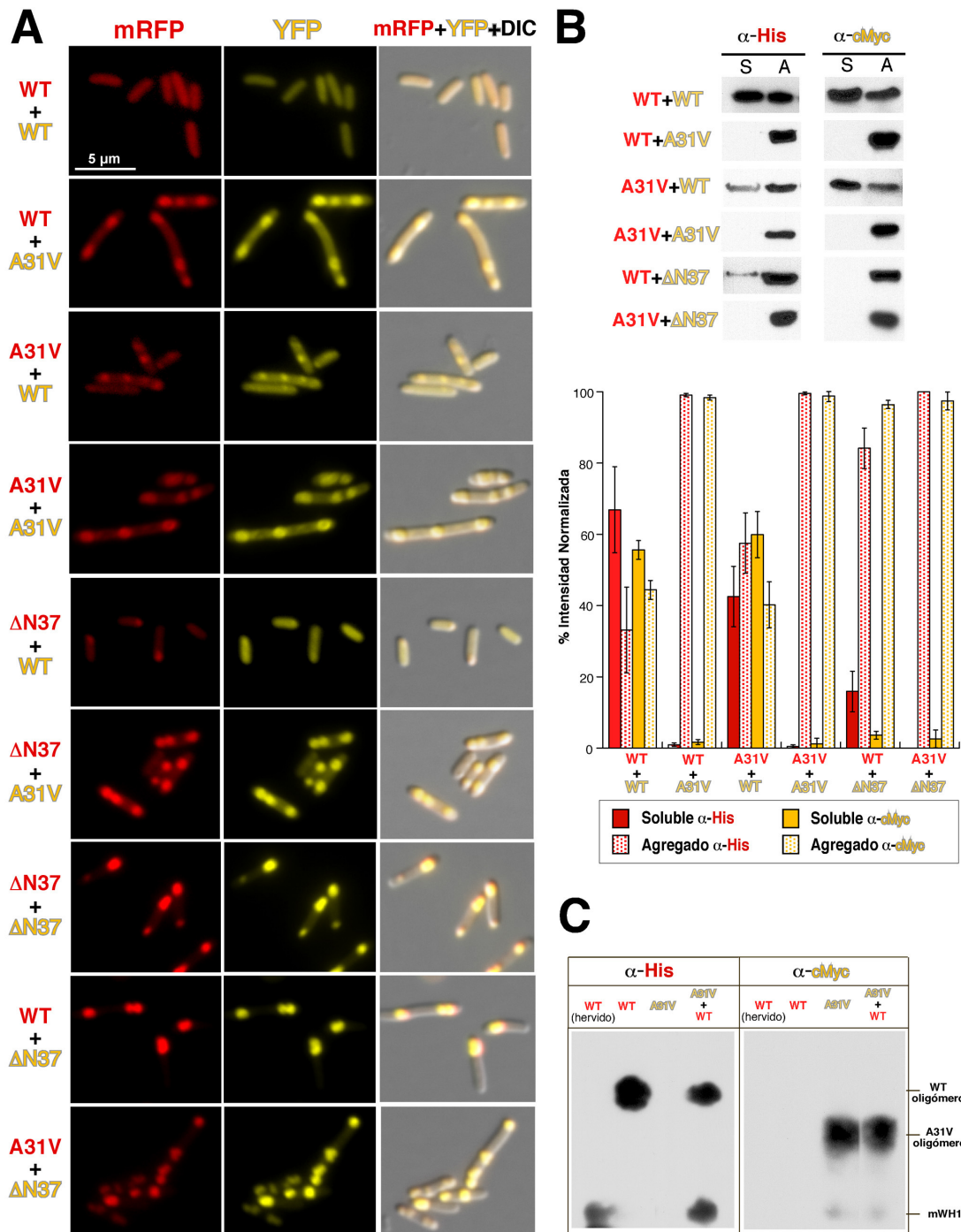


Figura 19: Coexpresión de las distintas variantes de RepA-WH1 fusionadas a mRFP o YFP. **(A)** Imágenes de microscopía de fluorescencia en dos canales (mRFP/YFP) y DIC de células de *E. coli* MDS42 coexpresando las variantes de RepA-WH1 (WT, A31V y ΔN37-mRFP/YFP). **(B)** Los análisis de solubilidad de las distintas proteínas se llevaron a cabo mediante sedimentación y posterior *Western-blot* utilizando anticuerpos específicos (α-His/mRFP, α-c-myc/YFP). Debajo se muestra un histograma representando la intensidad media estimada mediante densitometría a partir de tres expresiones y *Western-blots* independientes. La distribución intracelular de la fluorescencia junto con los balances soluble/agregado de las distintas coexpresiones sugieren una gradación en la fuerza o dominancia en la agregación amiloide de las variantes de RepA-WH1: A31V > ΔN37 >> WT. **(C)** Ensayo SDD-AGE para valorar la agregación de las variantes wt-mRFP y A31V-YFP coexpresadas o inducidas individualmente. Además de los monómeros (mWH1, más abundantes para el caso de la variante WT), se observan dos especies oligoméricas (WT y A31V) siendo de menor tamaño los producidos por la variante A31V (Molina-García y Giraldo, 2014).

	% Células con agregados					Longitud cel. (μm)
	0	1	2	3	≥ 4	
WT-mRFP + WT-YFP	77.5	16	6.5	0	0	2.67 \pm 0.79
WT-mRFP + A31V-YFP	0	7	58.5	19.5	15.5	5.07 \pm 1.46
WT-mRFP + YFP	100	0	0	0	0	3.87 \pm 1.13
WT-mRFP + ΔN37-YFP	0	43	39	13.5	4.5	3.91 \pm 1.30
A31V-mRFP + WT-YFP	0	5.5	41.5	33.5	19.5	3.89 \pm 1.32
A31V-mRFP + A31V-YFP	0	5	56	20.5	18.5	5.00 \pm 1.66
A31V-mRFP + YFP	11	6	37.5	17.5	28	5.25 \pm 1.54
A31V-mRFP + ΔN37-YFP	0	9	39.5	27	24.5	5.27 \pm 1.58
mRFP + WT-YFP	100	0	0	0	0	2.33 \pm 0.49
mRFP + A31V-YFP	0	10	64	21	5	4.91 \pm 1.26
mRFP + YFP	100	0	0	0	0	4.23 \pm 1.24
mRFP + ΔN37-YFP	0	90	10	0	0	3.21 \pm 0.83
ΔN37-mRFP + WT-YFP	45	52.5	2.5	0	0	2.04 \pm 0.59
ΔN37-mRFP + A31V-YFP	0	5.5	63.5	18.5	12.5	5.00 \pm 1.49
ΔN37-mRFP + YFP	86.5	11.5	2	0	0	3.79 \pm 1.15
ΔN37-mRFP + ΔN37-YFP	0	68	27.5	3	1.5	3.33 \pm 0.99

Tabla 5: Media del número de células sin y con distinto número de agregados. Las combinaciones de las variantes WT y Δ N37 con el mutante hiperamiloidogénico A31V muestran el mayor número de células con agregación múltiple. Los porcentajes mas altos de células sin agregados se corresponden, en general, con las combinaciones de la variante wt consigo misma o con los controles mRFP/YFP. Se representa además la longitud media de las células con las distintas combinaciones de plásmidos. Las mayores longitudes se obtuvieron en las combinaciones en las que se encontraba presente la variante A31V.

Los resultados obtenidos muestran que, además de los oligómeros resistentes a SDS característicos de la variante A31V (Gasset-Rosa y col., 2014), la variante WT se

ensamblaba formando agregados oligoméricos con menor movilidad electroforética (Molina-García y Giraldo, 2014).

En el caso de la variante $\Delta N37$, que se caracteriza por formar cuerpos de inclusión (Giraldo y col., 1998; Gasset-Rosa y col., 2014), su capacidad de promover la agregación de la variante WH1(WT) viene determinada por sus niveles de expresión: cuando se expresaba desde el vector p15A fusionada a YFP, los altos niveles de expresión de la variante $\Delta N37$ inducían la agregación de WH1(WT) en cuerpos de inclusión mono o bipolares; sin embargo, la expresión desde el RK2 daba lugar a niveles menores de la proteína que originaban cuerpos de inclusión más pequeños, en los que se producía una colocalización débil con la variante WT, pudiéndose detectar un gran exceso de ésta soluble en el citoplasma celular.

Como control, ninguna de las proteínas fluorescentes (mRFP o YFP) sin fusionar agregó cuando se co-expresaron con las distintas variantes de RepA-WH1 (Figura 20).

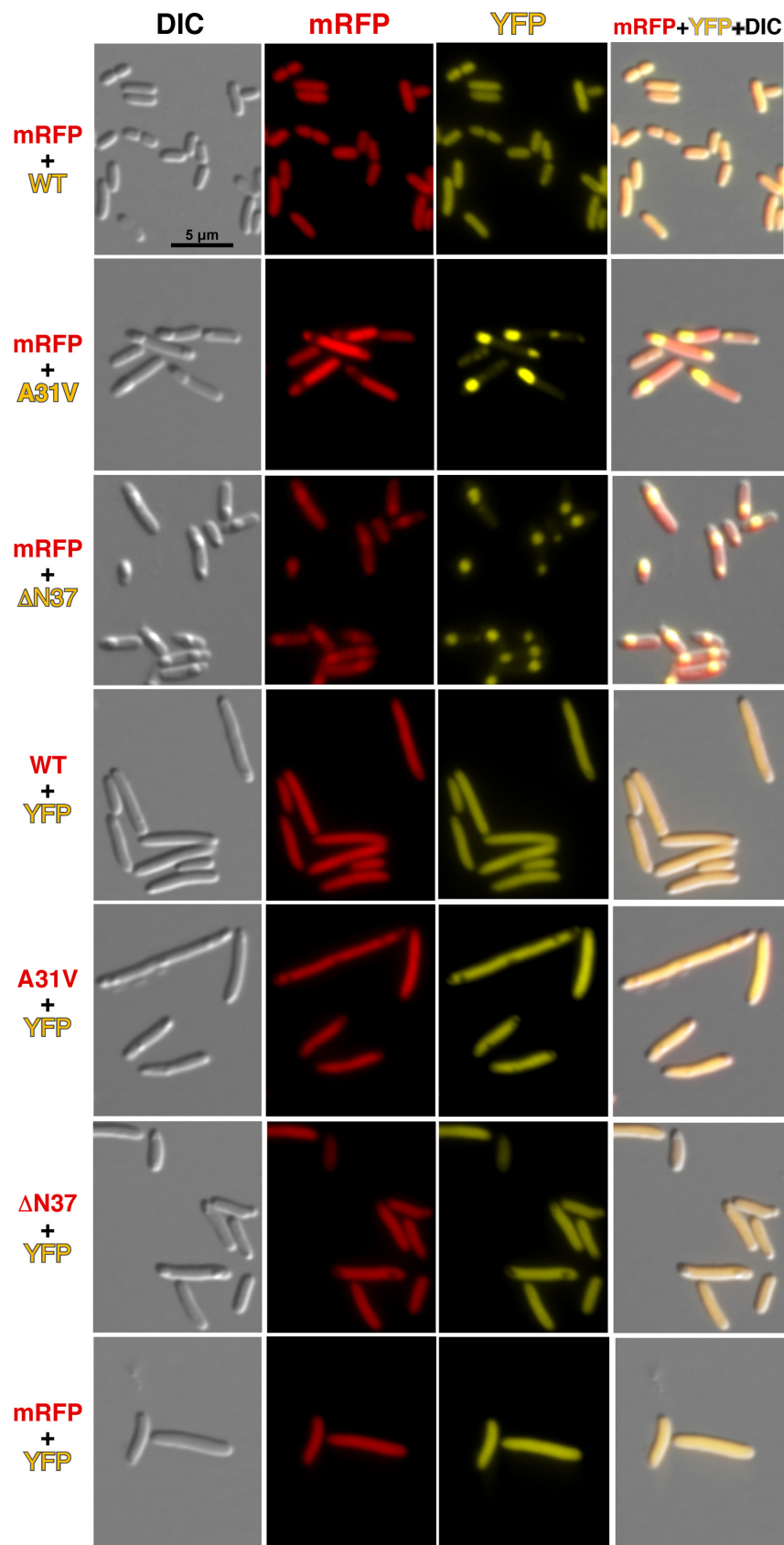


Figura 20: Imágenes de microscopía de fluorescencia y DIC de *E. coli* MDS42 co-expresando mRFP ó YFP con las distintas variantes RepA-WH1 (WT, A31V o ΔN37) fusionadas con el reportero fluorescente complementario (Molina-García y Giraldo, 2014).

2. Caracterización de las vías de toxicidad del prionoide RepA-WH1 en *E. coli*

2.1. El patrón de expresión génica de las células en las que se propaga RepA-WH1(A31V) es distinto al de la variante Δ N37

Para determinar las vías de toxicidad de la variante hiperamiloidogénica y agudamente citotóxica A31V del prionoide RepA-WH1, se optó por una aproximación genómica, comparando mediante *microchips* de ARN (*Affymetrix*) la transcripción génica global en bacterias que lo expresan con la de aquellas que expresan la variante mutante Δ N37, que se caracteriza por formar cuerpos de inclusión convencionales (Giraldo y col., 1998) y presentar toxicidad moderada (Gasset-Rosa y col., 2014). El objeto de esta comparativa fue poder sustraer del análisis toda aquella variación en la expresión génica que viniese determinada por una respuesta a la agregación general de proteínas (Δ N37), y no de manera específica al proceso de agregación amiloide (A31V).

Se extrajo por triplicado ARN de células que expresaban RepA-WH1 fusionada a mRFP en las dos formas mutantes a partir de vectores RK2 de bajo número de copias a distintos tiempos de inducción de su expresión: 30 min, 1 y 2,5 h, porque conforme a observaciones anteriores (Gasset-Rosa y col., 2014) células que expresan la variante A31V experimentan claramente ya citotoxicidad (filamentación, enlentecimiento de proliferación) a este último intervalo temporal. Se obtuvieron concentraciones de ARNs entre 0,5-1 μ g/ μ l en todos los casos. Los rangos de pureza de las muestras, determinados por la relación A_{260}/A_{280} , (1,9-2,1) se encontraban dentro de los límites que estipulaba el *kit* de extracción utilizado. Posteriormente se analizaron los perfiles del ARN extraído mediante electroforesis capilar en la Unidad de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), obteniéndose dos bandas mayoritarias en todos los casos correspondientes con los ARNs 16S y 23S (Figura 21).

Tras la hibridación de las muestras con los *microchips* de ARN, únicamente se consideraron significativas aquellas variaciones que suponían una diferencia del doble, o más del doble, en sobreexpresión o represión génica entre A31V y Δ N37 (ver Materiales y Métodos B.3.3).

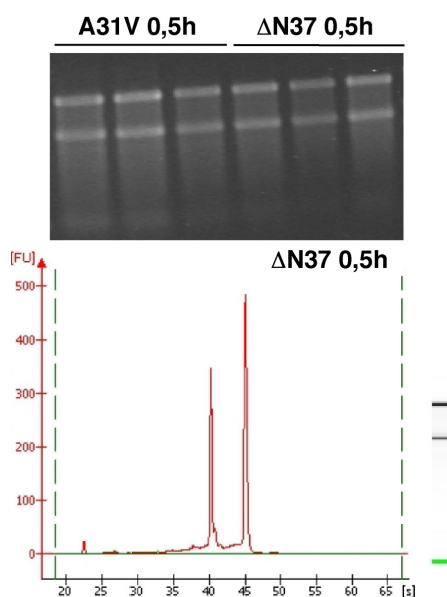


Figura 21: (arriba) Electroforesis en gel de agarosa (0,8% en TAE 1X) del ARN extraído de células de *E.coli* MDS42 después de 30 minutos de inducción de los mutantes WH1(A31V) y WH1(Δ N37). **Debajo** se muestra el perfil obtenido en el bioanizador de la Unidad de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid, donde se observan dos picos mayoritarios correspondientes a los ARNs 16S y 23S. Se obtuvo el mismo tipo de patrón para todas las muestras de ARN extraídas

Al analizar los resultados de transcriptómica diferencial se agruparon los genes en tres categorías temporales: tiempos cortos (genes cuya expresión estaba alterada a los 30 minutos, o a 30 min y 1 hora), tiempos medios (aquellos que únicamente aparecían alterados tras 1h de expresión) y tiempos largos (expresión génica alterada a 1h y 2,5h, o sólo a 2,5h). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 22. En general se observó un cambio en el patrón de expresión partiendo de una situación de represión génica a tiempos cortos (en verde), que se va invirtiendo hacia una situación de sobreexpresión a tiempos largos (en rojo). Los genes para los que se obtuvo un patrón de expresión génica alterado se agruparon por categorías funcionales según las proteínas para las que codificasen. Así, se encontraron alterados en su expresión genes que codificaban para: proteínas de membrana (externa e interna), proteínas implicadas en la regulación génica, proteínas de respuesta a estrés y proteínas que unen como cofactores metales de transición, especialmente ferroproteínas (Figura 22).

2.2. Co-agregación diferencial de los agregados A31V y Δ N37 con el proteoma de *E. coli*

Para determinar si existían diferencias entre las proteínas celulares que co-agregaban con los distintos tipos de agregados, amiloides (A31V) o cuerpos de inclusión (Δ N37), éstos se purificaron tal y como se describe en el apartado Materiales y Métodos (B.3.4). La identificación de los componentes del proteoma de *E. coli* presente en cada muestra agregada se llevo a cabo mediante espectrometría de masas tras separación

electroforética de sus componentes de los agregados en el Servicio de Proteómica del CIB-CSIC.

Los resultados así obtenidos se clasificaron según los mismos criterios aplicados para la aproximación genómica: tiempos cortos (proteínas que se detectaban preferencialmente en los agregados amiloides A31V a 30 minutos, o a este tiempo y 1 hora de expresión), tiempos medios (proteínas que únicamente aparecían coagregadas con A31V a 1h) y tiempos largos (proteínas presentes en las inclusiones amiloides a 1h y 2,5h, o sólo a este último tiempo) (Figura 23). Las proteínas detectadas se clasificaron según los mismos tipos funcionales que los genes alterados, encontrándose, de nuevo aunque en menor medida, proteínas de membrana (externa e interna), proteínas implicadas en la regulación génica, proteínas de respuesta a estrés y proteínas que unen metales de transición como cofactores.

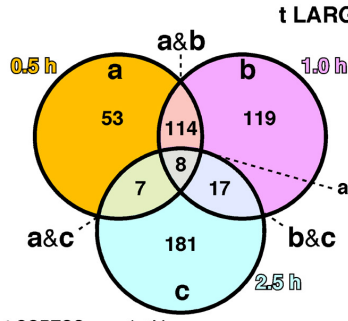
Figura 22: Listado de genes sobreexpresados (rojo) o reprimidos (verde) al menos el doble en células *E. coli* MDS42 que expresaban el mutante A31V en comparación con las que expresaban Δ N37. Los números en caracteres negros junto al nombre de cada gen, representan el factor de sobreexpresión (+) o represión (-) estimado al comparar RepA-WH1(A31V) con respecto a los de su variante Δ N37. En la parte superior se muestra un diagrama de Venn con los genes alterados a tiempos cortos (0,5 y 1h), medios (sólo 1h) y largos (1h y 2,5 h) de expresión. En la parte inferior se muestra una tabla clasificando funcionalmente los genes cuya expresión estaba alterada: proteínas de membrana citoplasmática y externa (MC/ME), reguladores de la expresión génica y la respuesta a estrés y proteínas que unen metales de transición (se indica su naturaleza con el símbolo del elemento) como cofactores.

WH1(A31V) VS. WH1(ΔN37)
amiloide / toxicidad aguda IBs / toxicidad moderada

t CORTOS (167)

Fe	<i>aegA</i>	-4.74	<i>narI</i>	-10.99	Fe*
	<i>aldA</i>	-4.41	<i>narK</i>	-3.80	*
	<i>ansB</i>	-14.08	<i>narX</i>	-4.65	*
	<i>aphA</i>	-2.01	<i>narY</i>	-4.11	Fe*
†	<i>bhsA</i>	2.15	<i>ndh</i>	2.42	Cu
†	<i>bsmA</i>	-3.31	<i>nikB</i>	-15.87	Ni*
	<i>carA</i>	2.37	<i>nikC</i>	-2.17	Ni*
	<i>carB</i>	-2.70/2.19	<i>nirB</i>	-12.66	Fe
*Fe	<i>ccmB</i>	-2.53	<i>nirC</i>	-9.09	Fe
*Fe	<i>ccmE</i>	-3.79	<i>nirD</i>	-16.13	Fe
*Fe	<i>cirA</i>	2.59	<i>nrfA</i>	-4.50	Fe
*	<i>cstA</i>	3.36	<i>nrfB</i>	-15.38	Fe
Cu	<i>cusS</i>	-2.65	<i>nrfC</i>	-11.36	Fe
*	<i>cycA</i>	-2.06	<i>nrfD</i>	-2.34	*
*Fe	<i>cydB</i>	-2.07	<i>nrfF</i>	-15.63	*
¶	<i>cytR</i>	2.15	<i>ompW</i>	-21.28	*
*	<i>dadA</i>	-3.34	<i>pepE</i>	-3.37	*
*	<i>dcuB</i>	-7.09	<i>prmA</i>	2.06	*
*	<i>dcuC</i>	-10.10	<i>pyrH</i>	2.19	¶
¶ Co/Mn	<i>dgt</i>	-2.11	<i>raiA</i>	-2.35	¶
*Mo/Fe	<i>dmsA</i>	-10.99	<i>ravA</i>	-2.87	†
*Fe	<i>dmsB</i>	-8.47	<i>rhaB</i>	-2.99	†
*	<i>dmsC</i>	-11.90	<i>rimI</i>	2.25	Zn
*	<i>dsdX</i>	2.21	<i>rspB</i>	-5.15	Fe*
	<i>ebgA</i>	-22.73	<i>rsxC</i>	-3.34/3.08	Fe*
Fe	<i>efeB</i>	-3.64/3.35	<i>sanA</i>	2.04	Fe
Zn/Fe	<i>efeO</i>	3.47	<i>sdhC</i>	-2.62	Fe
	<i>entC</i>	3.79	<i>srlR</i>	-6.21	¶
*Mo/Se/Fe	<i>fdnF</i>	-2.14	<i>tdcA</i>	-3.88	¶
*Mo/Fe	<i>fdnG</i>	-4.24	<i>tdcB</i>	-12.50	*
*Fe	<i>fdnH</i>	-7.04	<i>tdcC</i>	-4.12	*
Fe	<i>fes</i>	4.16	<i>tdcD</i>	-13.89	*
¶	<i>fh1A</i>	2.47	<i>tdcE</i>	-12.35	¶
Fe	<i>fhuF</i>	3.49	<i>tdcF</i>	-2.88	¶
¶ Fe	<i>fnr</i>	4.56	<i>tktB</i>	2.32	*
	<i>frdA</i>	-23.81	<i>tgSA</i>	-4.65	†
Fe	<i>frdB</i>	-6.02	<i>uspD</i>	-3.13	†
*	<i>frdC</i>	-13.16	<i>viaA</i>	-5.32	†
*	<i>frdD</i>	-2.70	<i>yaaJ</i>	-3.37	*
Fe	<i>fumB</i>	-4.61	<i>ycaM</i>	-2.43	*
Fe	<i>garD</i>	-2.70	<i>ycbJ</i>	-2.44	*
	<i>gcvT</i>	-2.92	<i>yccJ</i>	-9.80	Fe*
Fe	<i>glpA</i>	-3.64	<i>yccM</i>	-4.02	Fe*
	<i>glpB</i>	-2.77	<i>ychH</i>	2.45	†
†	<i>glpQ</i>	3.30	<i>ydjK</i>	-4.05	*
Mn	<i>gpmM</i>	-4.48	<i>ydjX</i>	-13.51	*
Fe	<i>hcp</i>	-2.09	<i>yehB</i>	-2.66	*
Fe	<i>hcr</i>	-6.90	<i>yehD</i>	-13.16	*
	<i>hisA</i>	-6.71	<i>yfaH</i>	-25.00	*
Fe	<i>hybA</i>	-15.38	<i>yfaZ</i>	2.13	*
*Fe	<i>hybB</i>	-2.20	<i>yfbS</i>	-3.09	*
*Ni	<i>hybC</i>	-2.44	<i>yfcC</i>	-2.52	*
Ni	<i>hybD</i>	-2.03	<i>yfcU</i>	-2.02	*
Ni/Zn	<i>hybF</i>	-4.07	<i>yfeO</i>	-2.62	Fe
*Ni/Fe	<i>hybO</i>	-11.49	<i>yfeX</i>	-2.31	Fe
Fe	<i>hyfA</i>	-3.77	<i>ygdH</i>	2.77/-3.11	¶
Ni/Zn	<i>hypA</i>	-3.00	<i>ygeV</i>	-12.50	¶
Ni/Zn	<i>hypB</i>	-9.90	<i>yggM</i>	-3.61	¶
	<i>hypC</i>	-2.44	<i>yhbS</i>	-7.35	¶
Fe	<i>hypD</i>	-9.90	<i>yhbU</i>	-5.03	¶
	<i>hypE</i>	-5.05	<i>yhbV</i>	-3.02	¶
Fe	<i>ilvD</i>	-3.70	<i>yhdH</i>	-2.59	Zn
	<i>ilvG</i>	-2.24	<i>yhfL</i>	-9.71	Ni
† Fe	<i>katG</i>	-28.57	<i>yhjA</i>	-2.70	¶ Ni
¶	<i>lrp</i>	-3.10	<i>yhjX</i>	-2.67	¶ Ni
	<i>lsrF</i>	-2.72	<i>yiaI</i>	-10.31	¶ Fe
	<i>malO</i>	-10.64	<i>yibO</i>	-2.12	¶ Mn
	<i>metK</i>	-3.15	<i>yihU</i>	2.58	†*
¶ Mn	<i>mntR</i>	2.33	<i>yijD</i>	-3.04	*
Mo	<i>moaC</i>	-2.71	<i>yjdO</i>	-3.79	*
Mo	<i>mocA</i>	-2.07	<i>yjeH</i>	-3.45	*
	<i>mviM</i>	2.03	<i>yjfN</i>	-3.09	*
*	<i>nagE</i>	-3.73	<i>yjjB</i>	-2.20	*
	<i>nanA</i>	-8.77	<i>yjji</i>	-8.55	*
	<i>nanE</i>	-2.51	<i>yncA</i>	-2.48	*
*	<i>nanT</i>	-2.20	<i>ynfK</i>	-16.67	*
Mo/Fe	<i>napA</i>	-2.96	<i>ynjE</i>	-2.01	Mo
Fe	<i>napB</i>	-8.85	<i>yohJ</i>	-2.28	*
*Fe	<i>napC</i>	-3.66	<i>yqgA</i>	-3.44	*
¶	<i>napD</i>	-5.99	<i>yqhA</i>	2.82	*
Fe	<i>napG</i>	-8.40	<i>yqhD</i>	-5.56	Zn†
*Fe	<i>napH</i>	-4.76	<i>ytjA</i>	3.38	*
*Mo/Fe	<i>narG</i>	-2.82	<i>zraS</i>	-2.84	*
*Fe	<i>narH</i>	-9.01			*

0.156 / 0.820



t CORTOS: a + (a&b)
t MEDIOS: b
t LARGOS: c + (b&c)

t MEDIOS (119)

*	<i>abrB</i>	-3.36	<i>sthA</i>	-2.39	¶
†*	<i>agpZ</i>	-2.24	<i>stpA</i>	2.80	¶
†	<i>astD</i>	3.86	<i>tnaA</i>	-2.70	¶
†	<i>bioD</i>	6.70	<i>tnaB</i>	-3.17	*
	<i>btuD</i>	2.16	<i>tnaC</i>	-2.30	*
¶	<i>btuE</i>	2.00	<i>tdrA</i>	-5.15	¶
†	<i>ccmC</i>	-3.30	<i>uspA</i>	2.09	¶
†	<i>ccmD</i>	-2.58	<i>ugpB</i>	2.84	¶
¶	<i>ccmF</i>	-2.16	<i>uidA</i>	2.13	¶
¶ Fe	<i>cydA</i>	-3.79	<i>uspA</i>	-3.75	¶
¶ Fe	<i>cysG</i>	-4.90	<i>wrbA</i>	-3.19	†
¶ Mo/Se	<i>cysP</i>	-3.13	<i>yadB</i>	2.02	†*
	<i>dhaK</i>	2.04	<i>yadI</i>	-2.14	¶
*	<i>dtpB</i>	-4.44	<i>yahN</i>	-2.16	*
*Fe	<i>efeU</i>	10.36	<i>ybdD</i>	-2.64	*
*	<i>entE</i>	7.75	<i>ybdZ</i>	2.27	¶
†*	<i>entS</i>	2.41	<i>ybfA</i>	-2.14	¶
*Fe	<i>fePA</i>	2.94	<i>ybgE</i>	-2.27	¶
Fe	<i>fePB</i>	4.81	<i>ybiW</i>	-2.46	¶
*Fe	<i>fePC</i>	4.83	<i>ybiY</i>	-4.00	Fe
*Fe	<i>fePG</i>	2.21	<i>yceA</i>	4.27	¶ Fe
*Fe	<i>fhuE</i>	7.38	<i>ycfP</i>	-3.32	¶
*Fe	<i>fiu</i>	3.19	<i>yciA</i>	2.09	¶
	<i>focA</i>	-2.14	<i>ydcH</i>	-2.10	¶
*	<i>fruB</i>	-2.35	<i>ydeJ</i>	-2.23	†
*	<i>fsaA</i>	-3.98	<i>ydeN</i>	-3.37	†
Fe	<i>ftnA</i>	-2.56	<i>ydhY</i>	-4.17	Fe
Fe	<i>fucO</i>	-2.26	<i>ydiE</i>	2.53	Fe
†	<i>gadA</i>	-3.51	<i>ydjY</i>	-3.94	¶
	<i>garL</i>	-2.65	<i>ydjZ</i>	-2.22	*
	<i>garP</i>	-3.14	<i>yecH</i>	-4.98	*
Fe	<i>glpB</i>	-4.63	<i>yeeF</i>	2.11	†
¶	<i>hole</i>	2.09	<i>yehA</i>	-2.18	*
	<i>hybE</i>	-3.72	<i>yehC</i>	-6.71	*
	<i>hybG</i>	-5.08	<i>yeiA</i>	-4.37	¶
	<i>kdpC</i>	2.04	<i>yeiT</i>	-2.94	Fe
	<i>livK</i>	2.12	<i>yfaD</i>	-3.28	Fe
Mn	<i>mela</i>	-2.11	<i>yfeK</i>	2.33	*Ni/Fe
	<i>melB</i>	-2.15	<i>ygcO</i>	-2.48	Fe
¶	<i>menG</i>	-2.54	<i>yhbP</i>	-2.89	Fe
Mo	<i>moaB</i>	-2.03	<i>yhbT</i>	-4.00	Fe
Fe	<i>napF</i>	-11.24	<i>yhcH</i>	-2.25	*
Mo	<i>narJ</i>	-6.17	<i>yhhQ</i>	2.15	*
†	<i>ndk</i>	3.62	<i>yhhX</i>	-2.02	Zn
*	<i>nikE</i>	-6.62	<i>yidF</i>	-2.58	Ni
¶ Ni	<i>nikR</i>	-2.38	<i>yieE</i>	-4.90	¶ Ni
¶	<i>nrdH</i>	3.64	<i>yieP</i>	-3.64	¶
†	<i>nth</i>	2.38	<i>yije</i>	-4.00	¶
†*	<i>oxyS</i>	7.94	<i>yjbK</i>	-2.24	¶
†*	<i>potG</i>	2.12	<i>yjdK</i>	-2.97	Zn¶
	<i>ppsA</i>	4.78	<i>yjjP</i>	-2.40	*
	<i>ptsA</i>	-2.87	<i>yjjW</i>	-8.13	Fe
*	<i>ribB</i>	-3.26	<i>yliI</i>	-4.78	*
*	<i>rnfD</i>	2.07	<i>yncE</i>	2.18	Fe¶
†*	<i>rsxA</i>	2.10	<i>ynfE</i>	-2.40	Mo/Se/Fe*
¶	<i>rybB</i>	2.83	<i>yobD</i>	-2.12	*
¶	<i>ryjA</i>	6.20	<i>yobJ</i>	7.52	*
Mo/Se	<i>sbp</i>	-2.06	<i>yqiJ</i>	-2.07	¶ Zn
*	<i>sppA</i>	-3.23	<i>yrdA</i>	-2.54	*
*	<i>srlE</i>	-2.88			*

0.342 / 0.658

t CORTOS t MEDIOS t LARGOS

* Proteínas de membrana (MC)	0.371	0.311	0.273
* Proteínas de membrana (ME)	0.036	0.034	0.002
† Expresión génica	0.066	0.109	0.258
† Respuesta a estrés	0.060	0.126	0.086
Me Unión a metales de transición	0.395	0.277	0.116

0.687 / 0.293

t LARGOS (198)

¶	<i>agp</i>	-2.64	<i>bbpG</i>	-8.33	
¶	<i>arcA</i>	-3.15	<i>pfkA</i>	-3.19/2.53	
Fe	<i>arnD</i>	3.98	<i>phnO</i>	2.38	
	<i>aroH</i>	6.08	<i>phnP</i>	3.34	Mn
	<i>aspA</i>	-3.01/2.52	<i>potC</i>	3.89	†*
*	<i>bcr</i>	2.51	<i>prfA</i>	2.04	¶
*	<i>b1c</i>	6.17	<i>proB</i>	-3.55	¶
¶	<i>btuC</i>	2.11	<i>pspG</i>	2.53	†*
†	<i>casD</i>	2.23	<i>pth</i>	4.03	¶
*	<i>ccmA</i>	-4.26	<i>ptsG</i>	2.49	*
¶	<i>cmoB</i>	2.06	<i>putA</i>	2.36	¶*
¶	<i>cnu</i>	-3.38	<i>puuA</i>	2.19	¶
¶	<i>coaE</i>	2.43	<i>pykF</i>	2.18	*
¶	<i>cobC</i>	-2.08	<i>qor</i>	2.71	Zn
¶	<i>cpdB</i>	2.92	<i>rara</i>	4.82	¶
†	<i>cpXP</i>	-2.17/2.12	<i>recQ</i>	2.32	Zn††
¶	<i>csrC</i>	-2.02	<i>recR</i>	2.46	¶†
*	<i>cysQ</i>	-4.52	<i>rfaE</i>	3.82	*
*	<i>cysW</i>	2.20	<i>rfcE</i>	-2.25	*
*	<i>dedA</i>	-2.28	<i>fffT</i>	3.22	*
Fe	<i>def</i>	-2.12	<i>rmuC</i>	2.44	¶
	<i>deoA</i>	3.49	<i>rnhB</i>	6.01	¶
¶	<i>dgoR</i>	2.49	<i>rph</i>	2.73	¶
*	<i>dgoT</i>	-2.01	<i>rplF</i>	2.09	¶
¶	<i>dgsA</i>	-3.06	<i>rplR</i>	2.44	¶
	<i>dkgA</i>	-2.64	<i>rpsC</i>	3.31	¶
¶	<i>dnaE</i>	2.16	<i>rsxC</i>	2.90	†*
¶	<i>dnaX</i>	-2.26	<i>sbcC</i>	2.38	¶
Fe	<i>dosP</i>	8.13	<i>shiA</i>	2.03	*
¶	<i>ebgR</i>	-2.53	<i>slYA</i>	-2.33	¶
*	<i>fabi</i>	2.03	<i>smP</i>	2.01	*
¶	<i>fadM</i>	3.72	<i>sucA</i>	2.14	¶
Zn	<i>fbAa</i>	3.10	<i>sufA</i>	19.73	Fe†
	<i>fic</i>	2.60	<i>talA</i>	3.20	¶
¶	<i>folB</i>	-2.07	<i>tgt</i>	2.09	Zn¶
¶	<i>fruR</i>	-2.28	<i>thiM</i>	-2.01	¶
*	<i>ftsB</i>	2.95	<i>thiQ</i>	2.13	*
*	<i>ftsI</i>	6.15	<i>trpS</i>	4.71	¶
¶	<i>ftsK</i>	2.09	<i>udk</i>	2.81	¶
¶	<i>fucK</i>	-2.38	<i>ugd</i>	2.14	¶
¶	<i>fucR</i>	2.50	<i>ugpC</i>	3.87	*
¶	<i>glgS</i>	-2.62	<i>ugpE</i>	2.15	*
¶	<i>glpC</i>	-2.56	<i>uidB</i>	2.85	*
¶	<i>glrR</i>	2.13	<i>uxaB</i>	-2.19	¶
¶	<i>gntU</i>	-5.35	<i>visC</i>	2.60	¶
¶	<i>gsiB</i>	-2.11	<i>xdhB</i>	3.78	¶
¶	<i>hcaR</i>	2.64	<i>xni</i>	2.41	¶
†	<i>hdeB</i>	2.76	<i>yabP</i>	2.55	¶
¶	<i>hflC</i>	-2.71	<i>yafE</i>	2.57	¶
Fe	<i>hisF</i>	2.18	<i>yagU</i>	12.81	†*
¶	<i>hisG</i>	-2.36	<i>yahO</i>	2.32	¶
*	<i>hofP</i>	2.04	<i>ybaA</i>	-2.36	¶
*	<i>hokB</i>	-2.28	<i>ybaB</i>	2.01	¶
¶	<i>holB</i>	2.72	<i>ybaS</i>	2.40	¶
¶	<i>hrpA</i>	2.10	<i>ybbN</i>	2.01	¶
¶	<i>hrpB</i>	3.56	<i>ybcH</i>	2.82	¶
¶	<i>hscA</i>	2.22	<i>ybiA</i>	-2.61	¶
Fe	<i>hscB</i>				

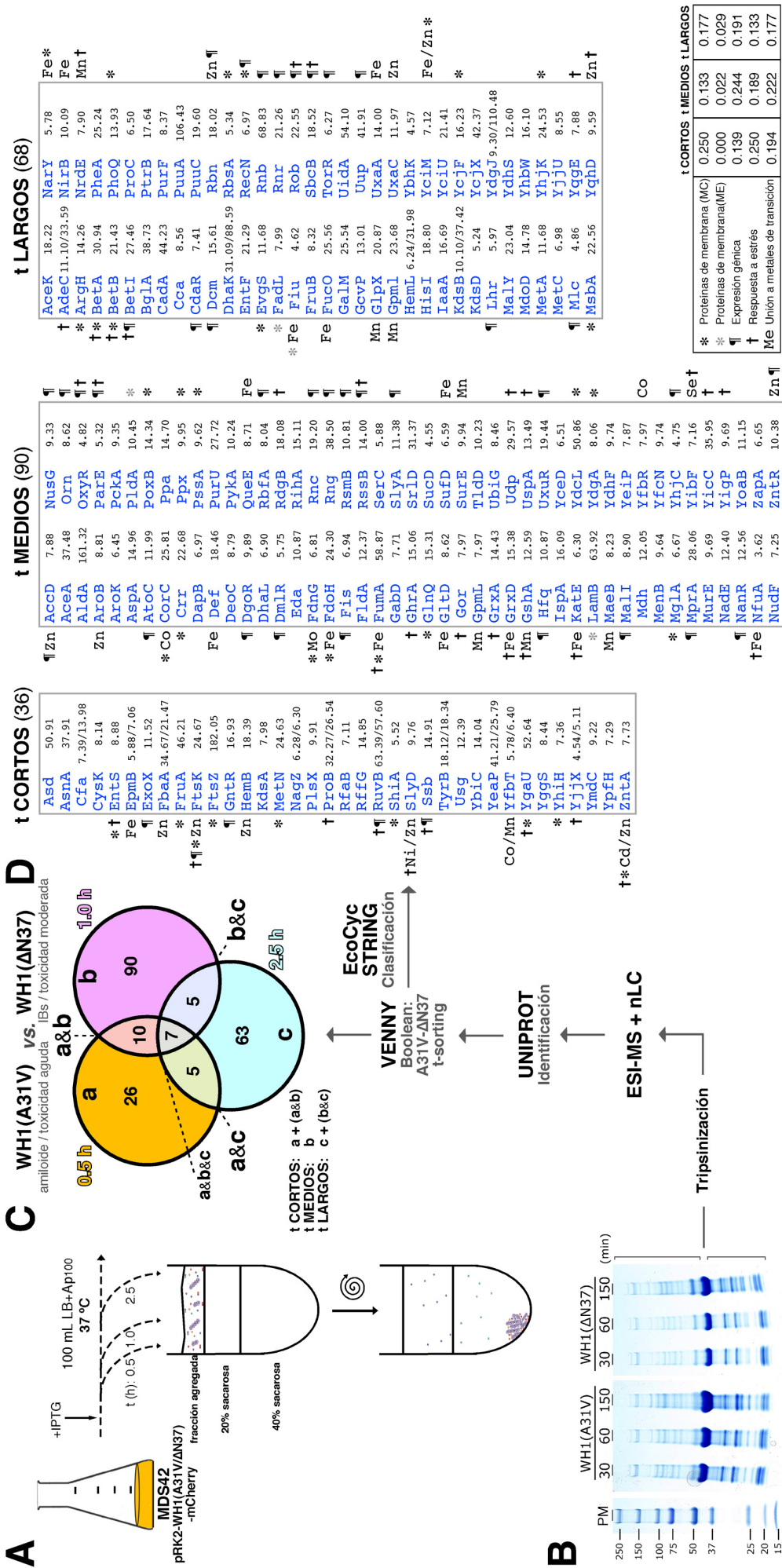


Figura 23: (A) Proceso de purificación de los agregados amiloideos (A31V) y los cuerpos de inclusión (AN37). Tras la inducción y la lisis de las células se purificó la fracción agregada mediante centrifugación en gradiente de sacarosa. **(B)** Dicha fracción se separó mediante SDS-PAGE. Las proteínas se sometieron a digestión con tripsina y espectrometría de masas y se identificaron utilizando la base de datos Uniprot. **(C)** Diagrama de Venn con las proteínas que coagregaban con los agregados del mutante hiperamiloidogénico A31V a tiempos cortos (30 min o 30 min y 1h), medios (sólo 1h) y largos (1h y 2.5 h o sólo 2.5h) de expresión. **(D)** Listado de las proteínas que coagregaban con los amiloideos de la variante A31V a tiempos de expresión cortos, medios y largos. Los números junto al nombre de cada proteína representan su factor de sobrepresencia en los agregados RepA-WH1(A31V) con respecto a los de la variante AN37. En la parte inferior se muestra una tabla clasificando funcionalmente estas proteínas utilizando los mismos criterios que en el caso de los resultados del análisis genómico: proteínas de membrana citoplasmática y externa (MC/ME), reguladores de la expresión génica y de la respuesta a estrés y proteínas que unen metales de transición como cofactores.

2.3. Identificación de potenciales dianas celulares mediante comparación de resultados “ómicos”

Se utilizó el servidor *EcoCyc* (Keseler y col., 2013) (ver Materiales y Métodos B.3.5) para comparar los resultados de las aproximaciones genómicas y proteómicas identificándose 47 genes o proteínas alterados en ambos conjuntos de datos, agrupados en 32 clústeres funcionales (Figura 24). Estos se agruparon a su vez en 8 superclústeres según su representación gráfica mediante el programa *STRING 9.1* (Franceschini y col., 2013), que muestra topológicamente cercanas aquellos genes o proteínas que están relacionadas funcionalmente (Figura 25). Los procesos alterados resultaron ser el metabolismo de nucleótidos y del fosfato, del nitrógeno, de aminoácidos como Gln, Glu, o la prolina (el principal osmorregulador de *E. coli*), metabolismo del azufre y del selenio (implicados, junto con el hierro, en el ensamblaje de los centros ferro-sulfurosos), sideróforos (captación de hierro), estrés oxidativo (detoxificación de peróxido de hidrógeno) y genes codificantes para NAD(P)H oxidoreductasas implicadas en la generación del gradiente protón motriz vía cadena respiratoria.

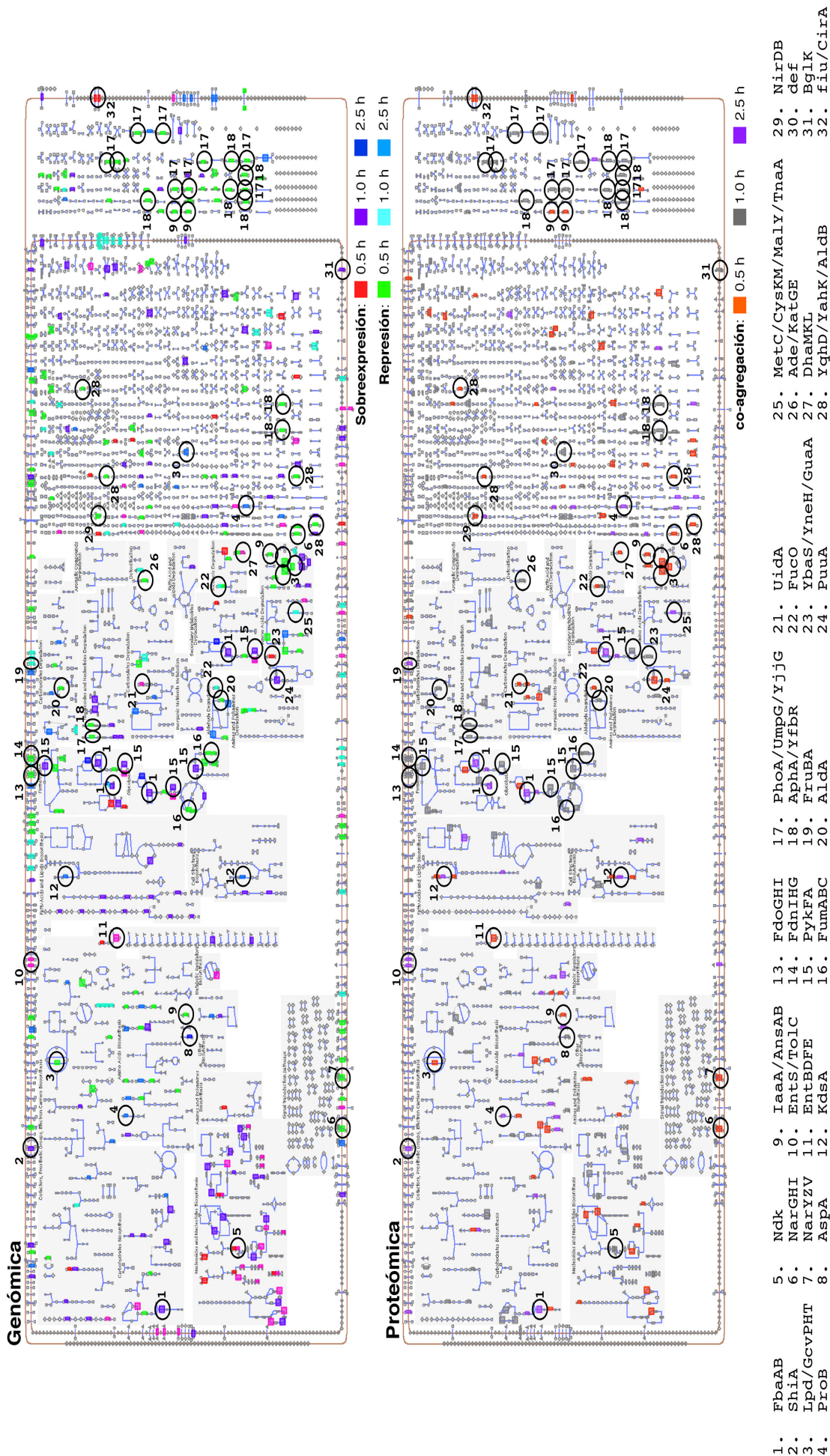


Figura 24: Representación obtenida al analizar los datos de genómica y proteómica utilizando el servidor *EcoCyc*. Se muestran esquemas idealizados de una célula tipo de *E. coli*, localizando en ella los genes (esquema superior) alterados preferentemente en A31V con respecto a AN37 a los distintos tiempos de inducción, bien por sobreexpresión o represión. En el esquema inferior se muestran las proteínas co-agregadas con las inclusiones amiloideas de A31V a los mismos tiempos post-inducción. Los círculos señalan los 32 grupos de dianas celulares potenciales que se encontraron alterados en ambas aproximaciones “ómicas”.

mayoría de éstas se encontraban reprimidas (Nuo A-N, SdhCDAB, GlpABC, DadA, FdnGHI, HyaABC, HybABC, CydAB, NarGHI, FrdABCD, NrfABCD) a excepción de la NADH oxidorreductasa II (*ndh*, Ndh-II) que estaba sobreexpresada. La alteración en los patrones de expresión de las oxidorreductasas nos llevó a pensar en una posible alteración en la cadena de transporte de electrones. Resultados previos del laboratorio, obtenidos por la Dra. Cristina Fernández en modelos citomiméticos de membrana (resultados no publicados), apuntaban a la interacción de RepA-WH1 con las membranas celulares. Cabía, por tanto, la posibilidad de que un daño en la membrana, derivado de la interacción con RepA-WH1(A31V) pudiese estar interrumpiendo la cadena de transporte de electrones, alterando indirectamente el patrón de expresión de las oxidorreductasas celulares. De ser así, el fallo en la cadena de transporte de electrones debería verse reflejado en un descenso de la tasa de utilización de oxígeno en condiciones aerobias, razón por la que se decidió medir el consumo de oxígeno en células de *E. coli* MDS42, expresando o no los mutantes A31V o Δ N37. Los resultados obtenidos muestran que, efectivamente, en el caso de las células que expresaban el mutante hiperamiloidogénico RepA-WH1(A31V) el consumo de oxígeno era menor que en las que expresaban Δ N37, y en ambos casos sustancialmente más reducido que en las células control MDS42 que no expresaban el prionoide (Figura 26).

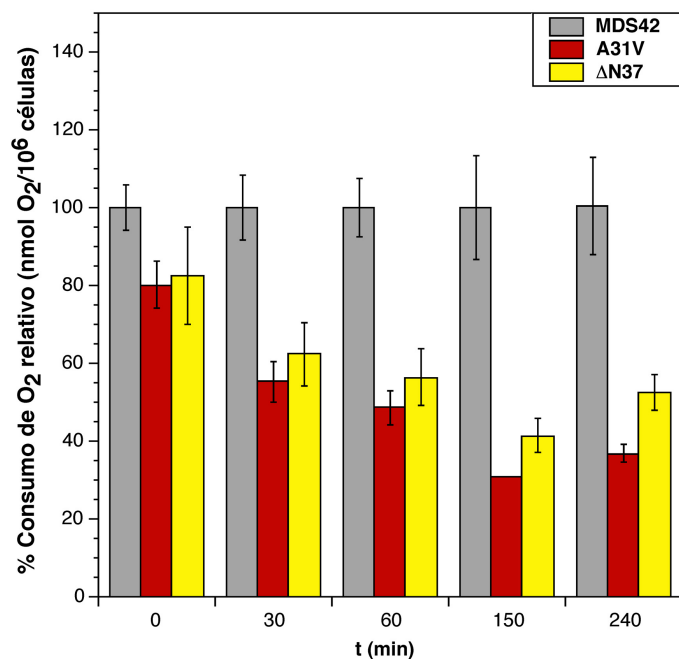


Figura 26: Media del consumo de oxígeno relativo de células de *E. coli* MDS42 expresando o no (gris) las variantes del prionoide RepA-WH1(A31V) (rojo) y RepA-WH1(Δ N37) (amarillo) a tiempos 0, 30 min; 1, 2,5 y 4 h post-inducción. A tiempos largos, el consumo de oxígeno de las células que expresaban el mutante A31V fue significativamente menor que el de las que expresaban Δ N37, y menor en ambos casos que el consumo de las células control MDS42 (gris). Sobre cada barra del histograma se representa su desviación estándar estimada a partir de 4 experimentos independientes.

2.4.2. La expresión de RepA-WH1(A31V) conlleva una disminución de los niveles de ATP celular

Otra consecuencia derivada de la variación del patrón de expresión génica de las oxidorreductasas celulares y del fallo en la cadena de transporte de electrones debería ser su efecto en la generación del gradiente protón motriz necesario para llevar a cabo una síntesis eficiente de ATP. Los niveles de ATP se valoraron tal y como se describe en la sección Materiales y Métodos (B.3.10). Los niveles de ATP en las células que expresaban el mutante A31V disminuyeron a lo largo del tiempo, presentando diferencias significativas con respecto al control en todos los tiempos de inducción, y respecto al mutante $\Delta N37$ tras 4 horas (240 min) de inducción (Figura 27).

Efectivamente, la expresión de RepA-WH1(A31V) reduciría la fosforilación oxidativa/síntesis de ATP como consecuencia de la reducción en el gradiente protón motriz y de la expresión aumentada de *ndh*.

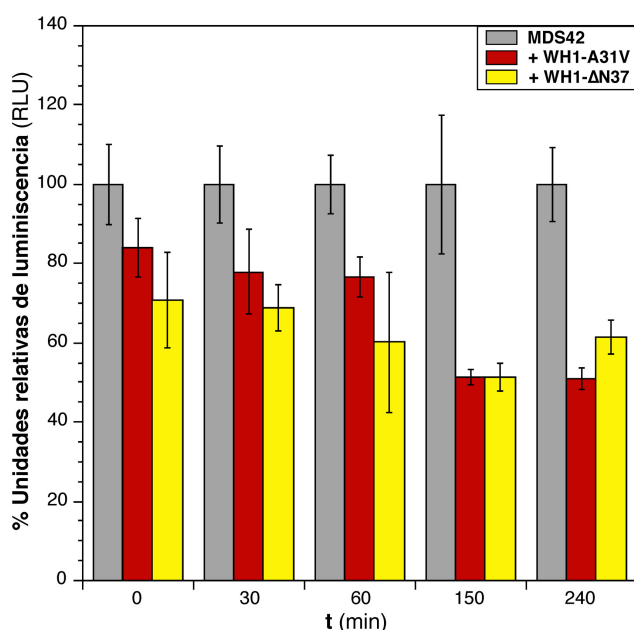


Figura 27: Media del nivel medio relativo de ATP en células de *E. coli* MDS42 expresando o no (gris) los mutantes A31V (rojo) y $\Delta N37$ (amarillo) del prionóide RepA-WH1 a tiempos 0, 30 min; 1; 2,5 y 4 h post-inducción. A tiempos largos, los niveles de ATP de las células que expresaban la variante A31V fueron significativamente menores que los de las que expresaban $\Delta N37$ y menores en ambos casos que los de las células control MDS42 (gris). Sobre cada barra del histograma se representan las desviaciones estándar de los valores obtenidos en 6 experimentos independientes.

2.4.3. La expresión del mutante A31V afecta al transporte a través de la membrana

Para valorar la integridad de la membrana, se evaluó la resistencia de las células al antibiótico aminoglucósido gentamicina (como se indica en el apartado Materiales y Métodos B.3.7). La presencia de un gradiente protón motriz en la membrana se requiere para que el antibiótico sea internalizado en el citoplasma de *E. coli* (Ezraty y col., 2013).

Los resultados obtenidos mostraron que la resistencia a la gentamicina por parte de las células que expresaban el mutante hiperamiloidogénico A31V era mayor que la de las células que expresaban $\Delta N37$, o que la de las células control MDS42, ya que las primeras alcanzaban mayores niveles de densidad óptica en presencia del antibiótico (Figura 28). Este resultado indica, por tanto, una reducción en el transporte dependiente de protones a través de la membrana en las células que expresaban la variante hiperamiloidogénica del prionoide RepA-WH1.

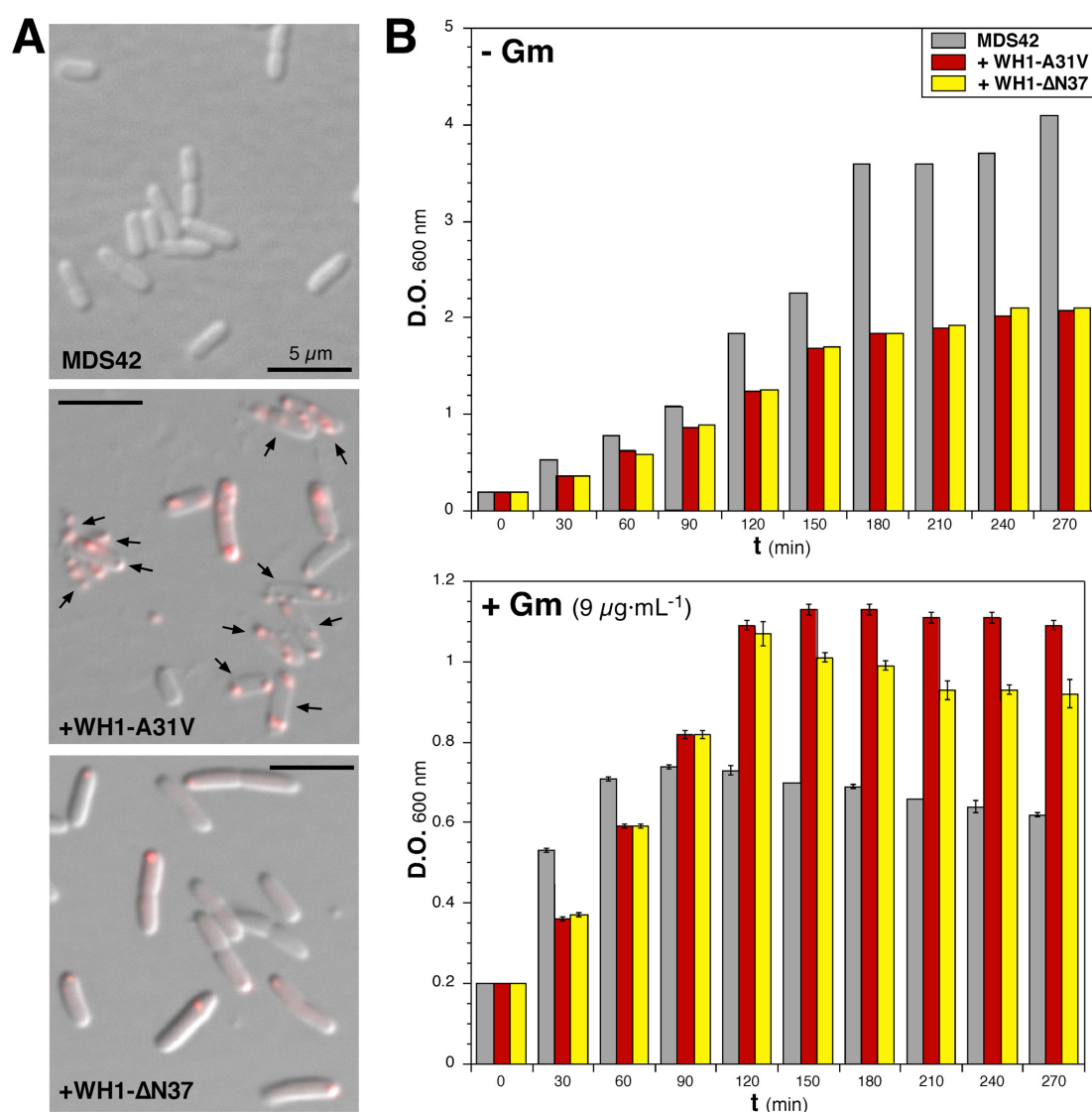


Figura 28: (A) Imágenes de microscopía (superposición fluorescencia roja + DIC) mostrando células de *E. coli* MDS42 expresando o no las formas mutantes A31V y $\Delta N37$ tras 2,5 h de inducción. Las flechas negras muestran la pérdida de turgor de las células que expresan la variante hiperamiloidogénica A31V. (B) Media de los niveles de densidad óptica a 600nm alcanzados por células de *E. coli* MDS42 expresando o no (gris) las formas mutantes A31V (rojo) o $\Delta N37$ (amarillo) del prionoide en presencia de concentraciones subinhibitorias de gentamicina (9 $\mu\text{g}/\text{ml}$), añadida 30 minutos después de la inducción de los mutantes por IPTG 0,5mM. La densidad óptica alcanzada fue mayor para las células que expresaban el mutante hiperamiloidogénico A31V (rojo); es decir, la resistencia al antibiótico fue mayor para estas células (rojo) que para las que expresaban $\Delta N37$ (amarillo), o para las células control MDS42 (gris).

2.4.4. La expresión del prionoide RepA-WH1(A31V) reduce la respuesta de detoxificación de H₂O₂

Se conoce que la sobreexpresión de la Ndh II no sólo afecta indirectamente a la disminución de los niveles de ATP celulares, al no contribuir a la generación de un gradiente protón motriz, sino que, además, genera especies reactivas de oxígeno (ROS), en concreto H₂O₂ y O₂⁻, producidas por su cofactor esencial FAD.

Además, entre los genes y/o proteínas que se mostraron alterados en ambos estudios “ómicos”, se encontraban aquellos relacionados con los mecanismos de detoxificación de H₂O₂ (Figura 22). Concretamente, el gen de la catalasa KatG fue el más reprimido de todos los analizados, mientras que la catalasa KatE coagregaba con el mutante hiperamiloidogénico RepA-WH1(A31V). Se valoró por tanto la sensibilidad de las células de *E. coli* MDS42 expresando mRFP (como control), o los mutantes A31V o ΔN37, tanto a H₂O₂ como a la acción del paraquat (generador del radical superóxido), como se indica en el apartado Materiales y Métodos (B.3.9.1). Los resultados obtenidos mostraron una mayor sensibilidad a H₂O₂ en las células que expresaban la variante A31V en relación a las que expresaban ΔN37 o solamente mRFP. Ésta se manifiesta por un aumento en el área del halo de inhibición del crecimiento en las células que expresan el mutante hiperamiloidogénico, disminuyendo en presencia de ascorbato (Figura 29).

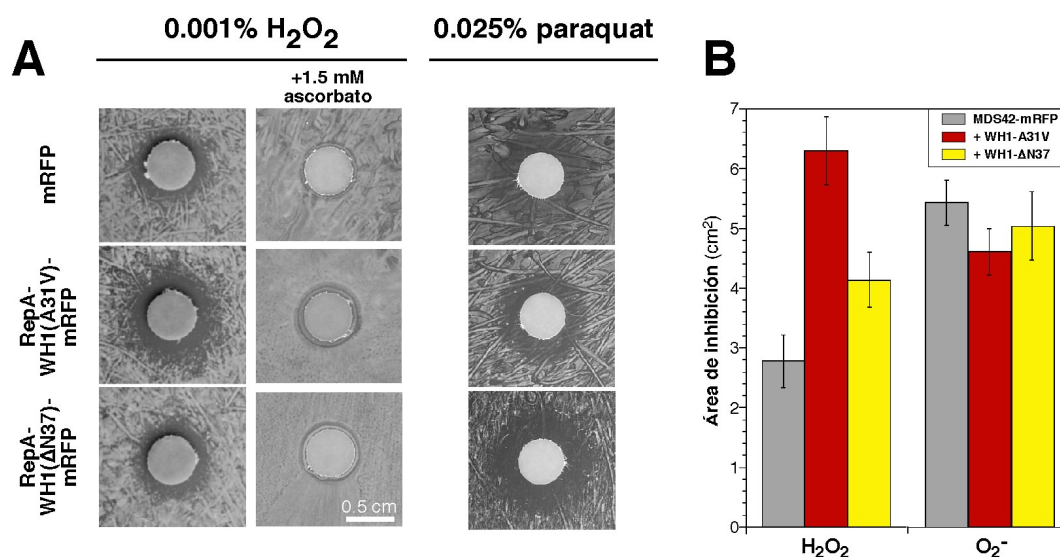


Figura 29: (A, B) Halos de inhibición del crecimiento en presencia de 0,001% H₂O₂, en ausencia y presencia de ascorbato **(A)**, o 0,0025% paraquat (O₂⁻) **(B)** de células de *E. coli* MDS42 expresando las variantes A31V o ΔN37 del prionoide RepA-WH1 o la proteína mRFP como control. **(C)** Media del área del halo de inhibición del crecimiento. La sensibilidad a peróxido de hidrógeno fue mayor para las células que expresaban la variante hiperamiloidogénica RepA-WH1(A31V) (rojo), que para las que expresaban ΔN37 (amarillo) o mRFP (gris). Sobre cada barra del histograma se representa su desviación estándar calculada para 12 experimentos independientes.

En cuanto a la sensibilidad al anión superóxido, no se obtuvieron diferencias entre las células que expresaban cualquiera de las tres proteínas estudiadas.

Para valorar el efecto de la sobreexpresión de Ndh-II como principal generador de ROS en nuestras condiciones experimentales, se repitió el experimento en un fondo genético Δndh . Los resultados indican que para obtener un efecto similar es necesario someter a las células a hasta 500 veces más de H_2O_2 , ratificando el papel de Ndh-II como principal generador de especies reactivas de oxígeno a consecuencia de la expresión de la variante hiperamiloidogénica del prionoide (Figura 30A). No obstante, éste no es el único mecanismo determinante de la hipersensibilidad a ROS dado que, incluso en fondo genético Δndh , se observó una mayor sensibilidad a H_2O_2 en las células que expresaban la variante A31V en relación a las que expresaban $\Delta N37$ o solamente mRFP (Figura 30B).

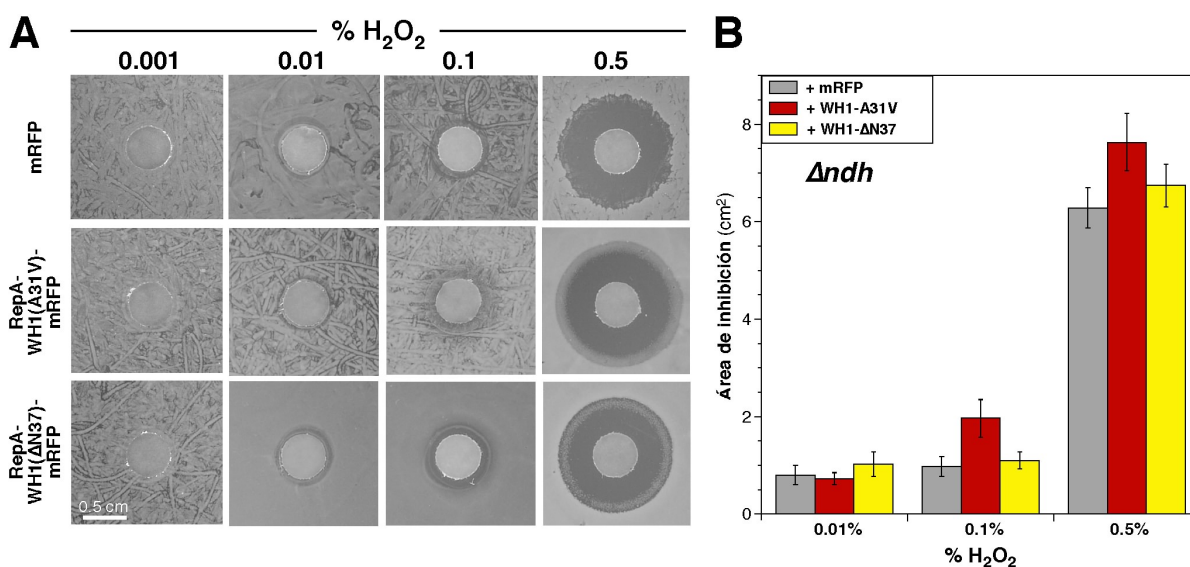


Figura 30: (A) Halos de inhibición del crecimiento en presencia de 0,001-0,5% H_2O_2 de células de *E. coli* SLC22 (Δndh) expresando las variantes A31V o $\Delta N37$ del prionoide RepA-WH1 o la proteína mRFP como control. **(B)** Media del área del halo de inhibición del crecimiento. La sensibilidad a peróxido es menor en fondo genético Δndh (Woodmansee e Imlay, 2002), ya que se requiere 500 veces más concentración de H_2O_2 para obtener el mismo efecto que en MDS42 (Figura 29). La sensibilidad a peróxido de hidrógeno fue mayor para las células que expresaban la variante hiperamiloidogénica RepA-WH1(A31V) (rojo), que para las que expresaban $\Delta N37$ (amarillo) o mRFP (gris). Sobre cada barra del histograma se representa la desviación estándar calculada para al menos 8 experimentos independientes.

Además de valorar la sensibilidad de las bacterias a distintas especies reactivas de oxígeno, se utilizó un sensor fluorescente de peróxido de hidrógeno, la proteína Hyper 3 (Belousov y col., 2006; Bilan y col., 2013). Ésta únicamente emite fluorescencia amarilla cuando se oxida en presencia de H_2O_2 , pero no de O_2^- . Se valoró la emisión de fluorescencia amarilla mediante microscopía de fluorescencia, tal y como se indica en el

apartado de Materiales y Métodos (B.3.9.2). Los resultados obtenidos muestran mayor intensidad de fluorescencia amarilla en las células que expresaban el mutante hiperamiloidogénico RepA-WH1(A31V) (Figura 31), lo que confirma la generación preferencial y aumentada de H₂O₂ en las células en las que se expresa esta variante del prionoide.

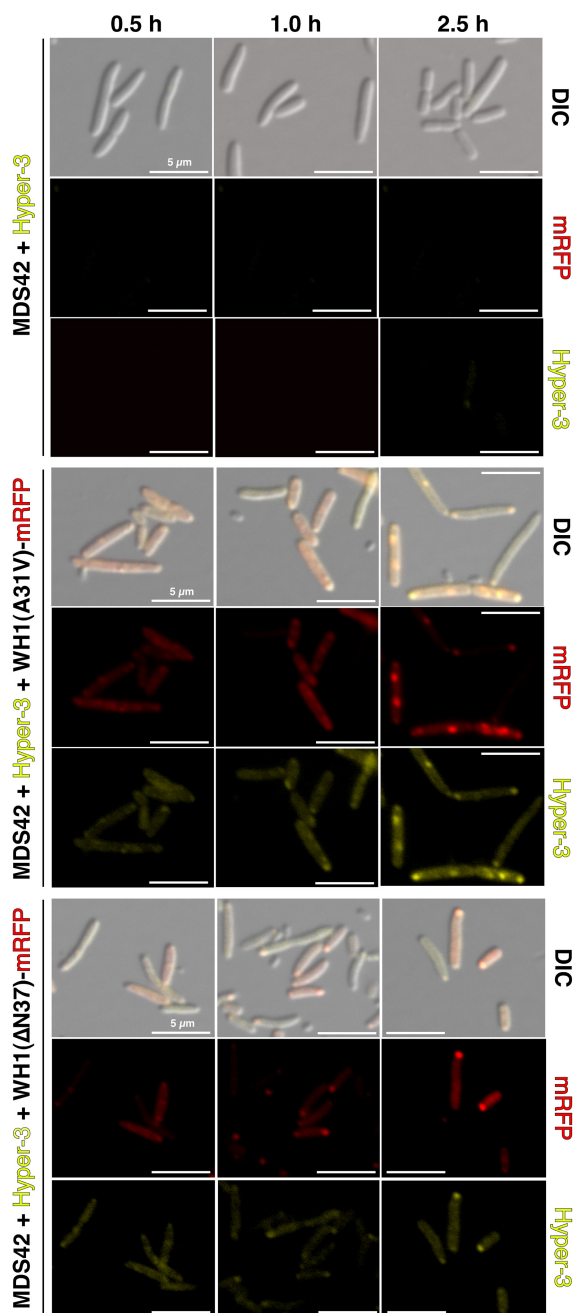


Figura 31: Imágenes de microscopía de fluorescencia en dos canales (rojo y amarillo) y DIC, de células de *E. coli* MDS42 expresando o no las variantes RepA-WH1(A31V) o WH1(ΔN37) en combinación con el sensor de H₂O₂, Hyper-3. La presencia de peróxido de hidrógeno oxida al sensor Hyper-3 permitiendo que emita fluorescencia amarilla. La intensidad de fluorescencia observada fue mayor para las células que expresaban A31V que para las que expresaban ΔN37, sugiriendo una mayor acumulación de H₂O₂ en las células que expresaban el mutante hiperamiloidogénico.

De esta manera, no sólo la sobreexpresión de Ndh-II, sino también la alteración directa de los genes y proteínas implicados en la detoxificación del peróxido de hidrógeno, estarían contribuyendo a incrementar los niveles de H₂O₂ en el interior de las células que expresaban RepA-WH1(A31V).

2.4.5. La expresión de la variante hiperamiloidogénica de RepA-WH1(A31V) afecta a la captación de hierro

En cuanto a los genes codificantes de proteínas implicadas en la captación de hierro desde el medio extracelular (sideróforos y sus transportadores), los resultados del análisis genómico indicaban que corresponden al conjunto de genes más netamente sobreexpresados en las células que expresaban el mutante hiperamiloidogénico RepA-WH1(A31V). Este conjunto de genes sobreexpresados codificaban para proteínas que intervienen en distintos puntos de la ruta de captación y reciclaje de hierro: bien sea en el ensamblaje de sideróforos (principalmente Fe³⁺-enterobactina), o en el transporte a través de la membrana externa (*fhuE*, *fepA*, *cirA*, *fiu*), del espacio periplásmico (*fepB*) y de la membrana interna (*fepC* y *fepG*).

Por otra parte, se encontraban reprimidos genes de numerosas enzimas que requieren hierro como cofactor (CcmBEF, CydAB, DmsAB, FdnGH, FrdB, FtnA, FumB, GlpBC, hcp/hcr, HybABO, HypD, IlvD, NapABCFGH, NarGHIY, NirBD, y NrfABC).

Estos resultados apuntaban a una disminución en los niveles intracelulares de hierro, razón por la que se valoraron los niveles intra y extracelulares de este metal en células de *E. coli* MDS42, expresando o no los mutantes RepA-WH1(A31V) o WH1(Δ N37) como se indica en el apartado Materiales y Métodos (B.3.6).

En cuanto a los niveles de hierro extracelular, no se observaron diferencias significativas entre las células que expresaban RepA-WH1(A31V) o WH1(Δ N37), pero sí con respecto a las células control MDS42 en las que se observó un descenso a lo largo del tiempo en el hierro presente en el medio extracelular. Este resultado concuerda, además, con el aumento del hierro intracelular detectado en estas mismas células, indicando que MDS42 era capaz de captar hierro desde el medio extracelular (Figura 32).

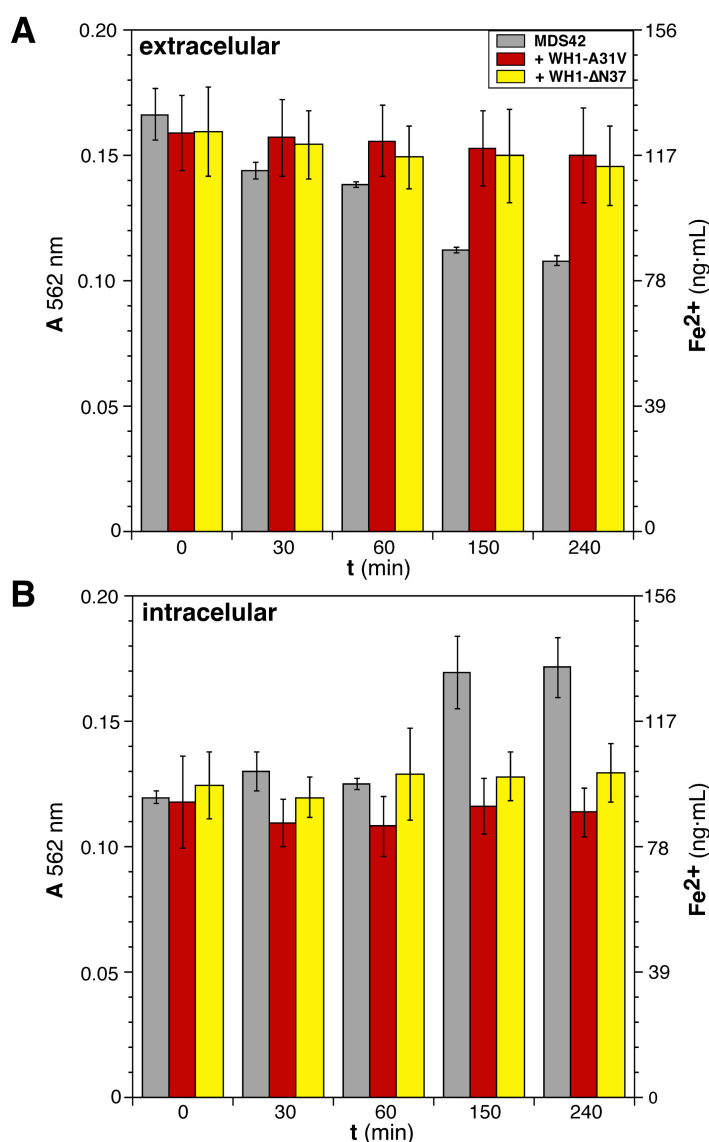


Figura 32: Media de la concentración de Fe^{2+} extra (A) e intracelular (B), de células de *E. coli* MDS42 expresando o no las variantes A31V o ΔN37 del prionoide RepA-WH1. Mientras que los niveles de hierro extracelular no disminuyeron en el caso de las células que expresaban ambos mutantes (rojo y amarillo), el descenso de Fe^{2+} en el medio, a lo largo del tiempo, fue significativo en el caso de las células control MDS42 (gris). Dicho descenso se correlaciona con un aumento intracelular del metal en MDS42 (gris). Los niveles intracelulares de Fe^{2+} en las células que expresaban el mutante hiperamiloidogénico A31V (rojo), fueron ligeramente menores que los de las que expresaban ΔN37 (amarillo), y menores que los de las células control. Sobre cada valor promedio (barra del histograma) se representa su desviación estándar, estimada a partir de 9 experimentos independientes.

Por su parte, los niveles de hierro intracelular obtenidos para la variante hiperamiloidogénica A31V de RepA-WH1 mostraron ser ligeramente menores, aunque no estadísticamente significativos, a los de ΔN37 para todos los tiempos en los que se realizó la medida. En cualquier caso, las diferencias entre los niveles de hierro intracelular de ambos mutantes fueron significativamente menores con respecto a los de las células control MDS42, sugiriendo un defecto en los mecanismos de captación de hierro asociados a la expresión del prionoide, tal y como indicaban los estudios genómicos y proteómicos.

3. Prionoides quimera WH1(R1-4)-RF1

3.1. Diseño de un sistema de cribado de amiloidosis en *E. coli* basado en la agregación de RF1

Se generó un sistema inspirado en las bases moleculares del prion de levaduras Sup35p. Como se ha descrito en la introducción, el gen *SUP35* codifica el factor de terminación de la traducción eRF3 de eucariotas que reconoce, junto con el factor de terminación eRF1, los codones de parada en el ARNm desencadenando el final de la síntesis proteica (Liebman y Chernoff, 2012; Tessier y Lindquist, 2009) (ver Introducción 3.2.4.). En un trabajo previo del laboratorio (Gasset-Rosa y Giraldo, 2015), se sustituyeron las repeticiones presentes en el dominio N de Sup35p por repeticiones en tándem del péptido amiloidogénico de RepA-WH1(A31V) (L₂₆VLCAVSLID₃₄; Giraldo, 2007). Dichas repeticiones fueron diseñadas para construir el núcleo de una estructura amiloide sintética, basada en el apilamiento de arcos- β (Kajava y col., 2010) (Figura 33; ver Figura 2). En este tipo de estructuras, las interacciones se establecen entre residuos que pueden ser bien de la misma naturaleza (polares con polares e hidrofóbicos con hidrofóbicos) o bien complementarios (carga positiva con negativa, como sucede con RepA-WH1 entre R₂₅ y D₃₅), lo que supone un aumento en el requerimiento de especificidad de secuencia (Ross y col., 2005; Shewmaker y col., 2011). Así, los segmentos hidrofóbicos heterólogos (WH1-R_n) se pliegan en zigzag gracias a la presencia de glicinas (G) en cada espaciador y las horquillas resultantes se estabilizan mediante interacciones iónicas entre residuos de aspártico (D) y arginina (R) que quedan enfrentados. Del apilamiento de sucesivos arcos- β , aportados por monómeros distintos surge una estructura fibrilar. Los resultados obtenidos por la Dra. Gasset-Rosa confirmaron que las repeticiones WH1(R_n) mantienen el fenotipo priónico en las levaduras: la lectura corrida de un codón de terminación prematuro en el gen *ade1-14* debida a la agregación de Sup35p; es decir, que las repeticiones del péptido amiloidogénico de RepA no interfieren en Sup35p con el resto de secuencias propias ricas en Q/N, reconstituyendo un determinante epigenético que se hereda de forma no mendeliana (Figura 8; Tessier y Lindquist 2009). De hecho, dos repeticiones de la secuencia amiloidogénica de WH1(A31V) son suficientes para obtener fenotipo [PSI⁺], si bien éste no se estabiliza hasta portar al menos 3 repeticiones (Gasset-Rosa y Giraldo, 2015). Teniendo en cuenta estos precedentes, se diseñó un sistema de cribado de amiloidosis en el cual la agregación de un factor de terminación de la

traducción bacteriano (RF1), inducida por la presencia de las mismas repeticiones en tándem del péptido amiloidogénico de RepA-WH1(A31V) que se habían mostrado funcionales en levaduras, produjese la lectura corrida de un codón de terminación prematuro en un gen reportero, siendo posible así la monitorización colorimétrica del estado amiloide en *E. coli* de manera análoga al sistema natural de *S. cerevisiae*. (Figura 33A).

La terminación de la síntesis proteica se produce cuando los factores de terminación (*releasing factors*, RF) reconocen un codón de parada en el ARNm en el sitio A del ribosoma. En *E. coli* existen tres factores de terminación. Dos de ellos, RF1 y RF2, se encargan del reconocimiento directo de los codones de parada con especificidad diferencial: RF1 reconoce los codones de terminación ámbar (UAG), RF2 los codones ocre (UGA) y ambos se encargan del reconocimiento de los codones ópalo (UAA) (Scolnick y col., 1968). Estudios detallados de la estructura de los ribosomas bacterianos en sus distintos estados funcionales han permitido caracterizar los detalles moleculares de los complejos de terminación de la traducción, en particular el mecanismo de acción de los RFs (Korostelev y col., 2008; Laurberg y col., 2008; Weixlbaumer y col., 2008). Tanto RF1 como RF2 son proteínas que mimetizan estructural y funcionalmente a los ARNt (Ito y col., 2000; Poole y col., 1998), ocupando el sitio A del ribosoma sobre los codones de terminación, exponiendo residuos aminoácidos que reconocen el triplete nucleotídico *stop* y proyectando sus respectivos dominios N-terminales hacia el exterior del ribosoma. Estudios genéticos y bioquímicos han demostrado que el mecanismo de reconocimiento implica la interacción del motivo PAT (Pro, Ala, Thr)/SPF(Ser, Pro, Phe) de RF1 y RF2, respectivamente, con el ARNm en el sitio A del ribosoma y, posteriormente, la interacción del motivo conservado GGQ de los RFs con el centro peptidiltransferasa, en la subunidad 50s del ribosoma, para producir la liberación de la cadena polipeptídica (Kisselev y col., 2003; Zavialov y col., 2002). El tercer factor, RF3 estimula la actividad de terminación de una manera independiente de codón (Milman y col., 1969) y se encarga, dependiendo del cofactor GTP, de la disociación de RF1/RF2 del ribosoma una vez que ha finalizado el proceso de traducción (Freistroffer y col., 1997; Bertram y col., 2001).

A pesar de que existe una gran homología de secuencia entre RF1 y RF2, que sugiere un origen común por duplicación génica (Craigén y Caskey, 1987), y de que ambos factores proyectan sus extremos N-terminales fuera del ribosoma, RF2 presenta un extremo N-terminal más extenso, formando una hélice- α extra, que no está presente en RF1 (Graille y

col., 2005). La ausencia de esa región dota de mayor flexibilidad al dominio N-terminal de RF1 (Shin y col., 2004). Esto hizo que se decidiese fusionar las repeticiones a RF1 y no a RF2, dado que sugería la capacidad de la proteína de acomodar un dominio N-terminal. Por otra parte, ambas proteínas presentan mayor grado de homología en el extremo carboxilo terminal, en el que reside la actividad peptidil-tRNA-hidrolasa, mientras que la especificidad en el reconocimiento del codón de terminación está mediada por regiones con secuencias divergentes (N-terminal) (Korostelev y col., 2008; Laurberg y col., 2008; Weixlbaumer y col., 2008). Además, RF2 presenta mecanismos de autorregulación, basados en un desplazamiento del marco de lectura a consecuencia de un codón UGA en fase en la posición 26 (Craigén y Caskey, 1987), que podrían dificultar el ajuste de las condiciones de inducción de quimeras basadas en este RF.

Todas las razones anteriormente expuestas fundamentaron el uso del factor RF1 de *E. coli*, fusionándolo a repeticiones en tándem del péptido amiloidogénico de RepA-WH1(A31V) para construir los prionoides quimera WH1(R0-4)-RF1. Éstos se clonaron en un vector RK2 bajo el control del promotor P_{tac} inducible por IPTG. Como gen reportero se utilizó el gen *lacZ*, clonado en un plásmido compatible, bajo el control de un promotor inducible por arabinosa, tanto en su versión silvestre (WT) como portando un codón prematuro ámbar (UAG) en posición A515 (Herring y col., 2003) (Figura 33B). Así se generan colonias de coloración azul o blanca, respectivamente, en presencia de X-Gal, en las condiciones de inducción empleadas en este trabajo (0,001% arabinosa; 0,003% glucosa) (Figura 33C).

3.2. Las quimeras WH1(R1-4)-RF1 complementan la deficiencia de *prfA* en *E. coli* MRA8

Los ensayos se realizaron en la estirpe MRA8 de *E. coli*, termosensible para el gen *prfA*, que codifica para RF1. Esta estirpe no es viable, por tanto, a 42°C en ausencia de complementación por RF1. Así, se valoró la capacidad de complementación del crecimiento al expresar las quimeras WH1(R1-4)-RF1 a 42°C empleando distintas concentraciones de inductor (IPTG: 0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25 mM), como se indica en el apartado de Materiales y Métodos (B.4.2). El escape basal del promotor P_{tac} , fue suficiente para complementar la deficiencia de RF1 celular en el caso de la quimera WH1(R0)-RF1, indicando que los niveles basales de RF1 son bajos en el interior celular a 30°C. En el caso de la quimera WH1(R3)-RF1, se requirieron concentraciones de inductor

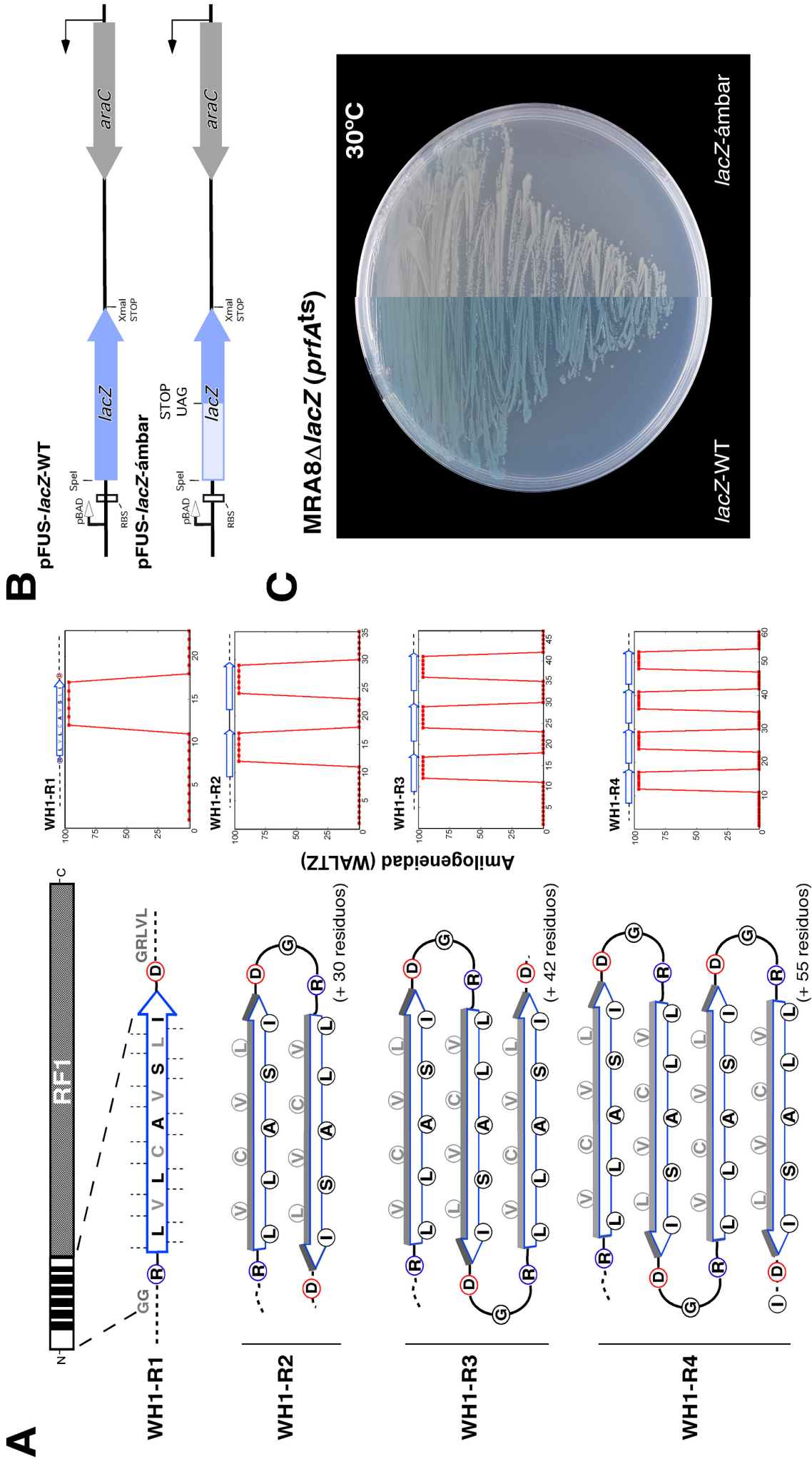


Figura 33: (A) Esquema de las quimeras RepA-RF1, a la derecha se muestra el potencial amiloide de cada una de las repeticiones del péptido amiloide de RepA (LVLCAVSLI) según se predicen por el algoritmo WALTZ (panel modificado de Gasset-Rosa, Tesis Doctoral, 2012). (B) Esquema de las construcciones de los genes reporteros *lacZ*-WT (arriba) y *lacZ*-ámbar (abajo). (C) Fotomontaje a partir de dos placas con los reporteros *lacZ*-WT y *lacZ*-ámbar. La inducción de éstos con 0,001% arabinosa y 0,003% glucosa da lugar a colonias azules y blancas respectivamente.

comprendidas entre 0,001 y 0,005mM para obtener un grado de complementación comparable a la situación fisiológica, fijándose finalmente las condiciones de inducción en 0,02mM (Figura 34).

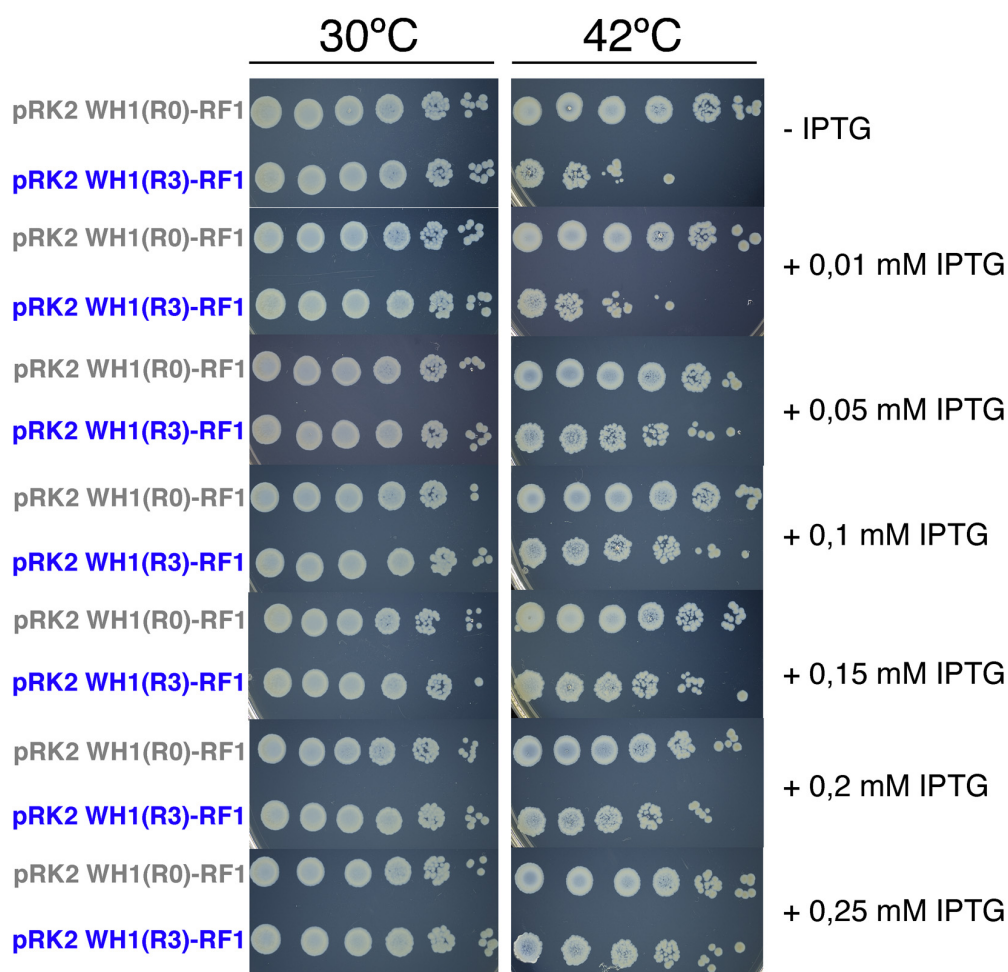


Figura 34: Crecimiento en placa de diluciones seriadas de células de *E. coli* MRA8ΔlacZ en presencia (30°C) o ausencia (42°C) de RF1 celular. Se valoró la capacidad de complementación de las quimeras WH1(R0) y WH1(R3)-RF1 utilizando distintas concentraciones de inductor de las mismas (IPTG) a 42°C. En el caso de la quimera WH1(R0)-RF1, el escape basal del promotor P_{tac} , complementó la deficiencia de RF1 celular. Para la quimera WH1(R3)-RF1, se requirieron concentraciones de inductor comprendidas entre 0,001 y 0,005 mM para obtener un grado de complementación comparable a la situación fisiológica, fijándose el inductor en 0,02mM para el resto de experimentos.

3.3. La expresión de las quimeras WH1(R2-4) -RF1 resulta en la lectura corrida de un codón de terminación UAG prematuro

Se valoró cualitativamente la aparición de colonias de coloración azul, tanto en medio sólido (LB agar) como en medio líquido (M9+CAA), al expresar las quimeras WH1(R1-4)-RF1 y los genes reporteros *lacZ* (WT/ámbar) en presencia de X-Gal. Ambas aproximaciones muestran que, mientras que la expresión a 42°C de las quimeras WH1(R0)-RF1 y WH1(R1)-RF1 en combinación con el reportero *lacZ*-ámbar da lugar a

colonias de coloración blanca, la expresión de WH1(R2-4)-RF1 a la misma temperatura genera colonias de coloración azul, indicando por tanto un defecto en la capacidad de terminación de la traducción de estas últimas (Figura 35A,B).

Esto no ocurre, sin embargo, en el caso de la expresión de las quimeras en combinación con el reportero *lacZ*-ámbar a 30°C. En este caso, en el que la terminación de la traducción no depende únicamente de la quimera WH1(Rn)-RF1, ya que se está produciendo RF1 funcional desde el cromosoma, todas las colonias tienen coloración blanca. Como control, se muestra la expresión de las quimeras en combinación con el reportero *lacZ*-WT, que genera colonias de coloración azul tanto a 30°C como a 42°C (Figura 35A).

Posteriormente, se valoró cuantitativamente la capacidad de lectura corrida midiendo la actividad β -galactosidasa, producto del gen *lacZ*. Así, tras determinar la actividad β -galactosidasa que se obtenía al combinar cada una de las quimeras con el reportero *lacZ*-WT y el reportero *lacZ*-ámbar a 42°C, se calculó el porcentaje de actividad β -galactosidasa del ámbar con respecto al wt para cada construcción (considerando 100% de terminación de la traducción el medido para cada una de las quimeras combinada con el reportero *lacZ*-WT) (Figura 35C). Este resultado, de nuevo, apuntaba a un fallo en la terminación de la traducción en el codón UAG prematuro del reportero *lacZ*-ámbar, ya que los niveles relativos de actividad enzimática varían entre un 5 y un 15% según el caso para las quimeras WH1(R2-4)-RF1, cosa que no ocurre para WH1(R0) y WH1(R1)-RF1, donde prácticamente no se detectó actividad β -galactosidasa, de lo que se deduce que estas quimeras son capaces de terminar la traducción de manera similar a la proteína silvestre RF1.

3.4. La expresión de WH1(R2-4)-RF1 produce una ralentización del metabolismo en *E. coli* MRA8 a 42°C

Las medidas de actividad β -galactosidasa se realizaron inicialmente 3h después de la inducción de la expresión de las quimeras WH1(Rn)-RF1 y los reporteros *lacZ*-WT/ámbar, tanto a 30°C como a 42°C. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 36A. Para las quimeras WH1(R0-1)RF1 en combinación con el reportero *lacZ*-WT los niveles de actividad fueron similares tanto a 30°C como a 42°C, indicando que el rango de concentración de inductor de las quimeras (0,02mM) es el adecuado, ya que se midieron niveles similares a los obtenidos con el RF1 celular (30°C). No obstante, no ocurrió lo mis-

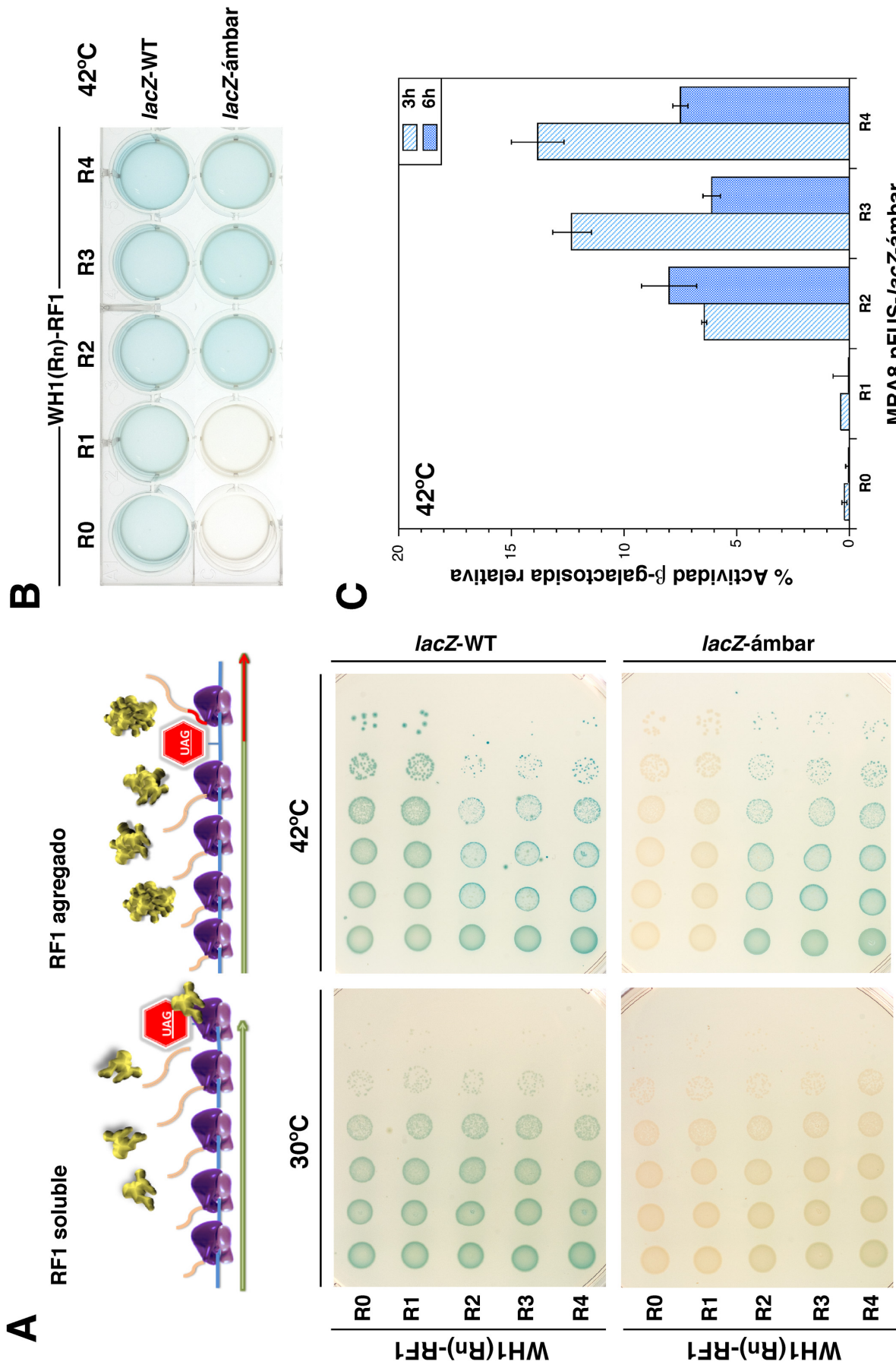


Figura 35: (A, arriba) Esquema del funcionamiento de RF1 según la hipótesis de partida: A 30°C, dado que se sintetiza RF1 celular funcional, éste sería eficiente en la terminación de la traducción en el codón UAG prematuro. A 42°C las repeticiones del péptido amiloide promoverían su agregación, impidiendo una terminación de la traducción eficiente en dicho codón, tal y como muestran los ensayos de lectura corrida en medio sólido (A, abajo), en medio líquido (B) y los niveles de actividad β -galactosidasa detectados (C).

mo en el caso de WH1(R2-4)-RF1, donde los niveles de actividad se desplomaron a 42°C.

Ante este resultado, se barajó la posibilidad de que se estuviese produciendo un segundo evento de lectura corrida a nivel del codón de terminación natural del reportero *lacZ*, ya que se trataba de un codón UAA que es también reconocido, aunque no exclusivamente, por RF1 como terminador de la traducción (Scolnick y col., 1968).

Con objeto de evaluar esta posibilidad, se mutó el codón de terminación UAA de los reporteros *lacZ* por UGA, codón de terminación que únicamente es reconocido por el *release factor 2* (RF2) (Scolnick y col., 1968) y se valoró la actividad β -galactosidasa obteniéndose el mismo resultado (dato no mostrado).

Dado que el fallo en la funcionalidad de las quimeras WH1(R2-4)-RF1 no sólo afectaría a nuestro gen reportero sino también a todas las proteínas de la célula cuyo codón de terminación fuese UAG, cabía la posibilidad de que el metabolismo celular se ralentizase, afectando a la viabilidad. Para valorar esta alternativa se realizó una cinética de actividad β -galactosidasa utilizando la quimera WH1(R2)-RF1 y el gen reportero *lacZ*-WT tanto a 30°C como a 42°C. Los resultados obtenidos muestran que, mientras en el caso de la expresión a 30°C los niveles de actividad aumentaban rápidamente a las 3h de inducción para posteriormente ir decayendo de manera gradual, la expresión a 42°C producía una acumulación mas lenta y progresiva de la enzima a lo largo del tiempo, igualándose los niveles de actividad detectados a 30°C y 42°C a las 6h post-inducción (Figura 36B). Se valoró pues la actividad β -galactosidasa a las 6h post-inducción, obteniéndose valores similares para cada una de las quimeras, tanto a 30°C como a 42°C (Figura 36C). Se calculó el porcentaje de actividad relativo del reportero ámbar con respecto al wt, que se muestra en la figura 35C, tanto a 3 como a 6h post-inducción.

3.5. La lectura corrida del codón de terminación prematuro UAG se debe a la agregación de las quimeras WH1(R2-4)-RF1

La determinación bioquímica de los niveles de síntesis de las proteínas de fusión WH1(R0-4)RF1 se realizó mediante *Western-blot*, utilizando como epítipo la etiqueta His6 localizada en el extremo N-terminal de cada una de las quimeras. Se detectaron todas las quimeras, tal y como se muestra en la figura 37A. Además de las bandas correspondientes al tamaño (aproximadamente 50 kDa) de los monómeros de las proteínas de fusión, se

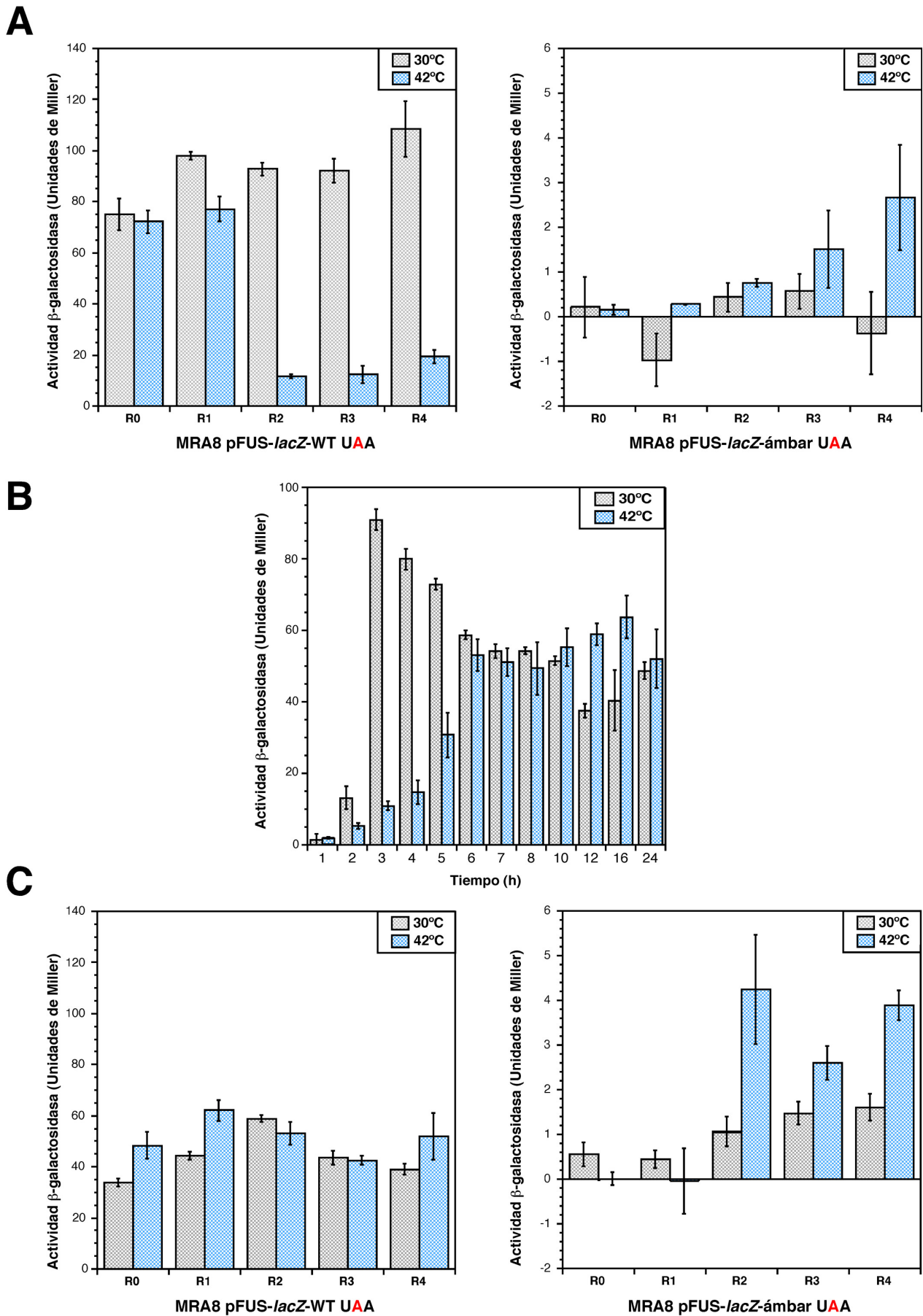


Figura 36: Niveles de actividad β -galactosidasa expresados en unidades de Miller a las 3h (**A**) y 6h (**C**) post-inducción de las quimeras WH1(R0-4)-RF1 y los genes reporteros *lacZ*-WT y ámbar (izquierda y derecha, respectivamente). (**B**) Cinética de actividad β -galactosidasa de la quimera WH1(R2)-RF1 en combinación con el reportero *lacZ*-WT.

detectó una banda de proteólisis a la altura de 25 kDa y una fracción agregada, retenida cerca de los pocillos.

La presencia de oligómeros resistentes a SDS se valoró mediante electroforesis en gel de agarosa en condiciones semidesnaturalizantes en presencia de detergente (SDD-AGE) figura 37B. De nuevo, también mediante esta técnica, se detectaron los monómeros de las distintas quimeras WH1(R_n)-RF1, así como dos tipos distintos de oligómeros: unos de menor peso molecular, presentes en todas las quimeras, y otros de mayor peso molecular únicamente detectables en las quimeras WH1(R1-4)-RF1 pero no en la construcción WH(R0)-RF1.

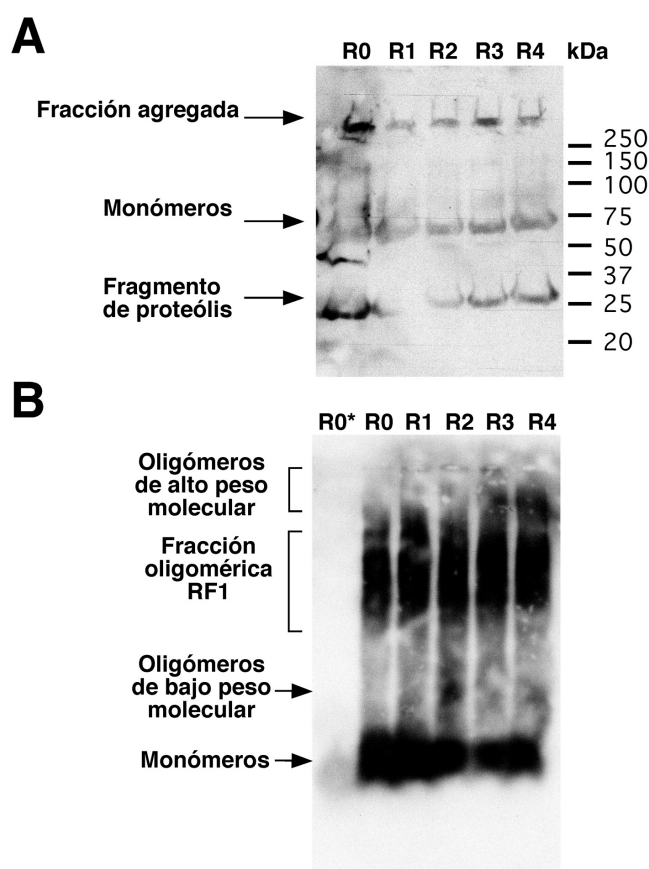


Figura 37: (A) Western-blot: α -His (1/500) de células de *E. coli* MRA8 Δ lacZ (0,2 unidades de D.O) inducidas con 1mM de IPTG durante 3h. (B) SDD-AGE: α -His (1/500) de lisados (10 μ l) de las mismas células (25ml a D.O=2). (* R0 hervido desnaturalizado, α anti).

3.6. El tratamiento con resveratrol recupera la función de terminación de la traducción en las quimeras WH1(R2-4)-RF1

Una vez desarrollado el sistema de cribado para la detección de secuencias amiloides basado en las quimeras WH1(R_n)-RF1, nos propusimos, como prueba de concepto de la sensibilidad y potencial biotecnológico del sistema, ensayar distintos compuestos

polifenólicos descritos previamente como inhibidores, *in vitro*, de la agregación amiloide de proteínas. Las moléculas ensayadas fueron: quercetina (Villar-Piqué y col., 2012), curcumina (Yang y col., 2005), epigallocatequina-3-galato (E3G) (Ehrnhoefer y col., 2008; Hyung y col., 2013), resveratrol (Ladiwala y col., 2010) y miricetina (Ono y col., 2012). Los ensayos se realizaron en medio líquido y en placas multipocillo, a 42°C, tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos (B.4.3). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 38.

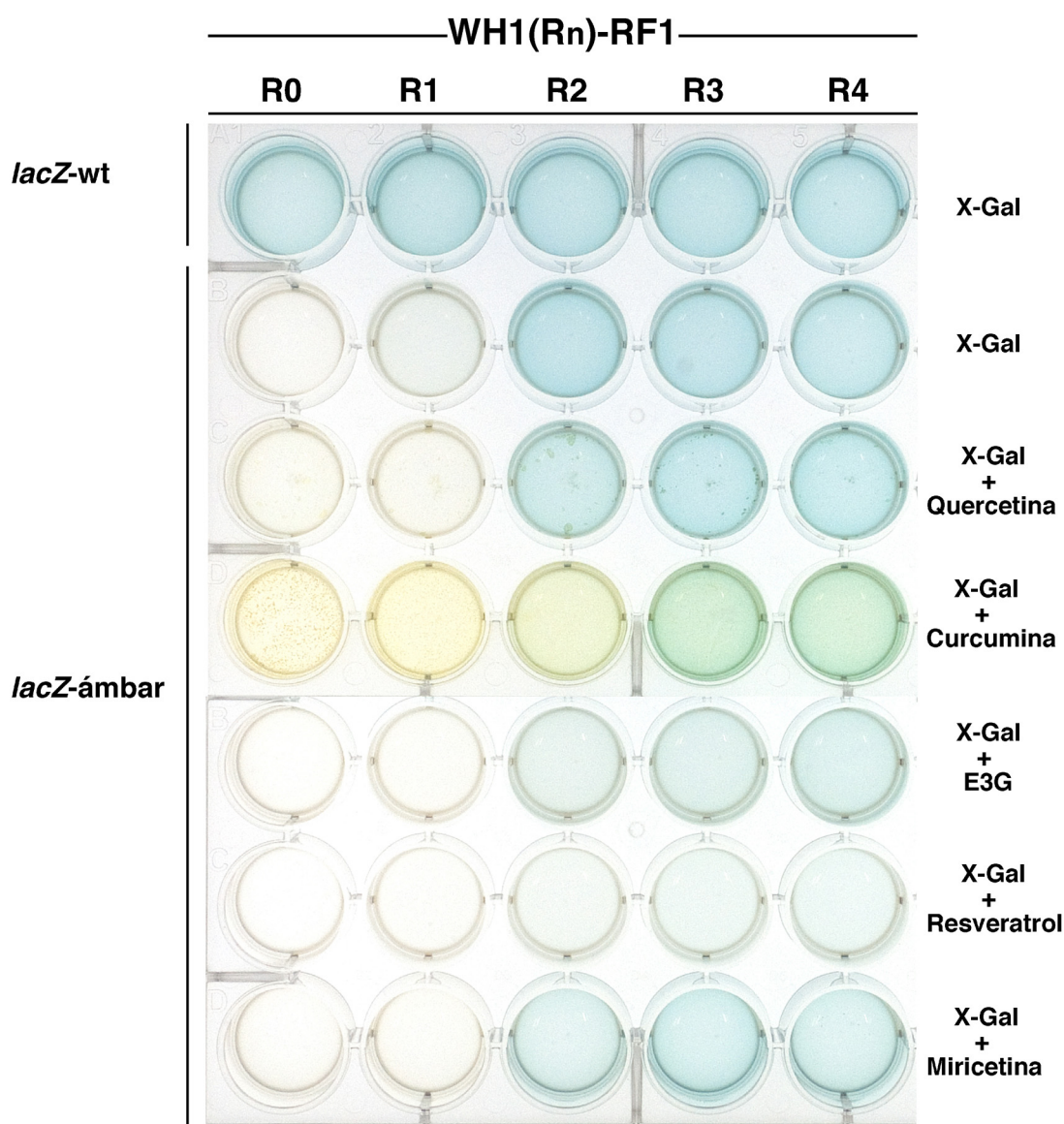


Figura 38: Ensayo *in vivo*, sobre células de *E. coli* MRA8Δ*lacZ*, de la acción de inhibidores conocidos de la amiloidosis. La presencia de E3G y, especialmente, resveratrol durante la expresión de las quimeras WH1(R2-4)-RF1, en combinación con el reportero *lacZ*-ámbar, revierte el fenotipo de coloración azul característico (fila 2) pasando a ser células prácticamente blancas (filas 5 y 6). En la fila 1 se muestran, como control, células MRA8Δ*lacZ* expresando las distintas quimeras WH1(Rn)-RF1 en combinación con el reportero *lacZ*-WT, siendo todas ellas azules.

De todos los compuestos utilizados, únicamente la E3G y el resveratrol parecían influir el fenotipo de coloración: las células MRA8 Δ *lacZ* que expresaban las quimeras WH1(R2-4)-RF1 en combinación con el reportero *lacZ*-ámbar, pasaron de tener coloración azul cuando se crecían en presencia de X-Gal y en ausencia de inhibidores, a reducir la intensidad de la misma (en el caso de la E3G) o incluso llegar a ser prácticamente blancas (en presencia de resveratrol). No se observó efecto alguno de la miricetina. Aunque la curcumina parecía revertir el fenotipo de agregación de la quimera WH1(R2)-RF1, se descartó su uso debido a su coloración amarilla intensa y a su reducida solubilidad en el medio empleado (M9+CAA). En el caso de la quercetina, las repeticiones del ensayo pusieron de manifiesto una gran variabilidad para este compuesto, siendo capaz de reducir la intensidad de coloración hasta un punto comparable a la E3G según el ensayo (dato no mostrado), con lo cual se incluyó en el siguiente paso del cribado: los controles sobre el reportero *lacZ*-WT.

Para descartar que el efecto en la coloración se debiese a una acción directa sobre la enzima β -galactosidasa y no sobre la agregación de las quimeras, se realizaron controles expresando las quimeras WH1(R0) y WH1(R3)-RF1 en combinación con el reportero *lacZ*-WT, en presencia y ausencia de E3G, resveratrol y quercetina. Además, se valoró la actividad β -galactosidasa de dichas células tras 24 h de inducción.

Los resultados obtenidos mostraron tanto una disminución en los niveles de actividad β -galactosidasa (Figura 39A) como una reducción de la coloración (Figura 39B) en las células que expresaban las quimeras WH1(R0) y WH1(R3)-RF1 en combinación con el reportero *lacZ*-WT en presencia de quercetina y E3G. Estos resultados sugieren una inhibición directa de la actividad β -galactosidasa por ambos polifenoles. Sin embargo, la presencia de resveratrol durante la inducción de las quimeras no produjo una disminución de la coloración, indicando que el efecto observado en las quimeras WH1(R2-4) en fondo *lacZ*-ámbar no se producía sobre la enzima β -galactosidasa, sino sobre la agregación de las quimeras (Figura 39B). Además, en las células tratadas con resveratrol, las medidas de actividad β -galactosidasa mostraron una reducción de la misma para la quimera WH1(R0)-RF1 pero no para la quimera WH1(R3)-RF1 en la que los valores fueron incluso algo superiores a los del control tratado únicamente con 0,4% DMSO (concentración final del solvente de los inhibidores) (Figura 39A). Este resultado podría indicar un efecto beneficioso específico del resveratrol sobre aquellas quimeras donde las repeticiones de la secuencia amiloidogénica de RepA estaban causando agregación de

RF1, permitiendo terminación natural en el codón de terminación natural UAA en comparación con el control, pero no en aquellas quimeras donde no se estaba dando agregación, WH1(R0), en las que el tratamiento con resveratrol parecía tener cierta toxicidad de naturaleza indeterminada.

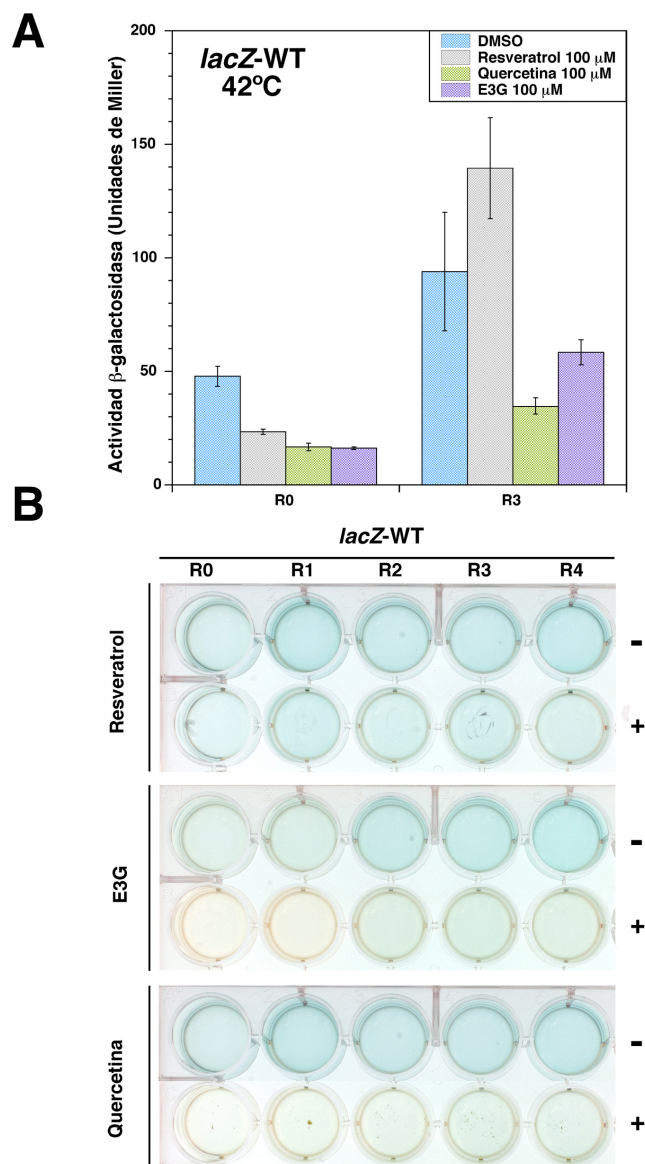


Figura 39: Ensayo de inhibidores polifenólicos de amiloidosis. Controles *lacZ*-WT. Los niveles de actividad β -galactosidasa **(A)** fueron mayores para las células que expresaban la quimera WH1(R3)-RF1 tratadas con resveratrol, indicando un efecto beneficioso específico del resveratrol sobre aquellas quimeras donde las repeticiones de la secuencia amiloidogénica de RepA estaban causando agregación de RF1. Además el resveratrol fue el único compuesto que no afectó significativamente a la coloración azul **(B)**.

Para confirmar esta hipótesis, se realizó el mismo experimento expresando las distintas quimeras en combinación con el reportero *lacZ*-ámbar en presencia y ausencia

de resveratrol (Figura 40). La actividad β -galactosidasa se normalizó para cada construcción, siendo el 100% la actividad en ausencia de resveratrol en cada caso. Los resultados obtenidos mostraron que para las quimeras WH1(R0) y WH1(R1)-RF1, en las que no se produce un cambio de coloración de blanco a azul en los ensayos de lectura corrida del codón de terminación prematuro, los niveles de actividad β -galactosidasa aumentan en presencia de resveratrol, pudiendo indicar una mayor toxicidad del compuesto al promover en estas quimeras un aumento en su agregación. No obstante, dados los bajos niveles absolutos de actividad enzimática detectados (< 1 unidad de Miller) podríamos encontrarnos dentro de los márgenes de error del ensayo (Tabla 6). Sin embargo, en el caso de las quimeras WH1(R2-4)-RF1, el tratamiento con resveratrol produce una disminución en la actividad β -galactosidasa del 56, 50 y 30%, respectivamente (con respecto a cada control sin tratamiento), indicando un efecto beneficioso del compuesto, probablemente al aumentar la capacidad de terminación de la traducción en el codón UAG prematuro.

	Actividad β -galactosidasa (Unidades de Miller)				
	R0	R1	R2	R3	R4
DMSO	0,24 \pm 0,08	0,36 \pm 0,21	11,87 \pm 1,35	4,88 \pm 0,40	5,50 \pm 0,80
Resveratrol (100 μ M)	0,47 \pm 0,09	0,60 \pm 0,22	5,20 \pm 1,31	2,44 \pm 0,35	3,80 \pm 0,55

Tabla 6: Valores absolutos de actividad β -galactosidasa de células MRA8 Δ lacZ expresando las quimeras WH1(Rn)-RF1 en combinación con el reportero lacZ-ámbar, 24h postinducción en presencia y ausencia de resveratrol. Los valores de actividad disminuyen para las quimeras WH1(R2-4)-RF1 un 56, 50 y 30%, respectivamente. Sin embargo, aunque los niveles aumentan para las quimeras WH1(R0-1)-RF1, estos siguen siendo muy bajos, inferiores a una unidad de Miller.

Con objeto de esclarecer el efecto ejercido por el resveratrol en las quimeras WH1(R0-1)-RF1 se realizaron curvas de crecimiento de la estirpe *E. coli* MDS42 en presencia y ausencia de resveratrol (100 μ M) para valorar su toxicidad sobre el crecimiento de las mismas. Las curvas de crecimiento (Figura 40C) indicaron que no existían diferencias en el tiempo de generación de MDS42 en presencia y ausencia de resveratrol ni a 37°C ni a 42°C, por lo tanto el efecto tóxico observado en la estirpe MRA8 que expresa la quimera WH1(R0)-RF1 (Figura 39A) parece ser dependiente de dicho fondo genético, en el que el resveratrol podría contribuir a aumentar la agregación intrínseca de RF1, más que tener

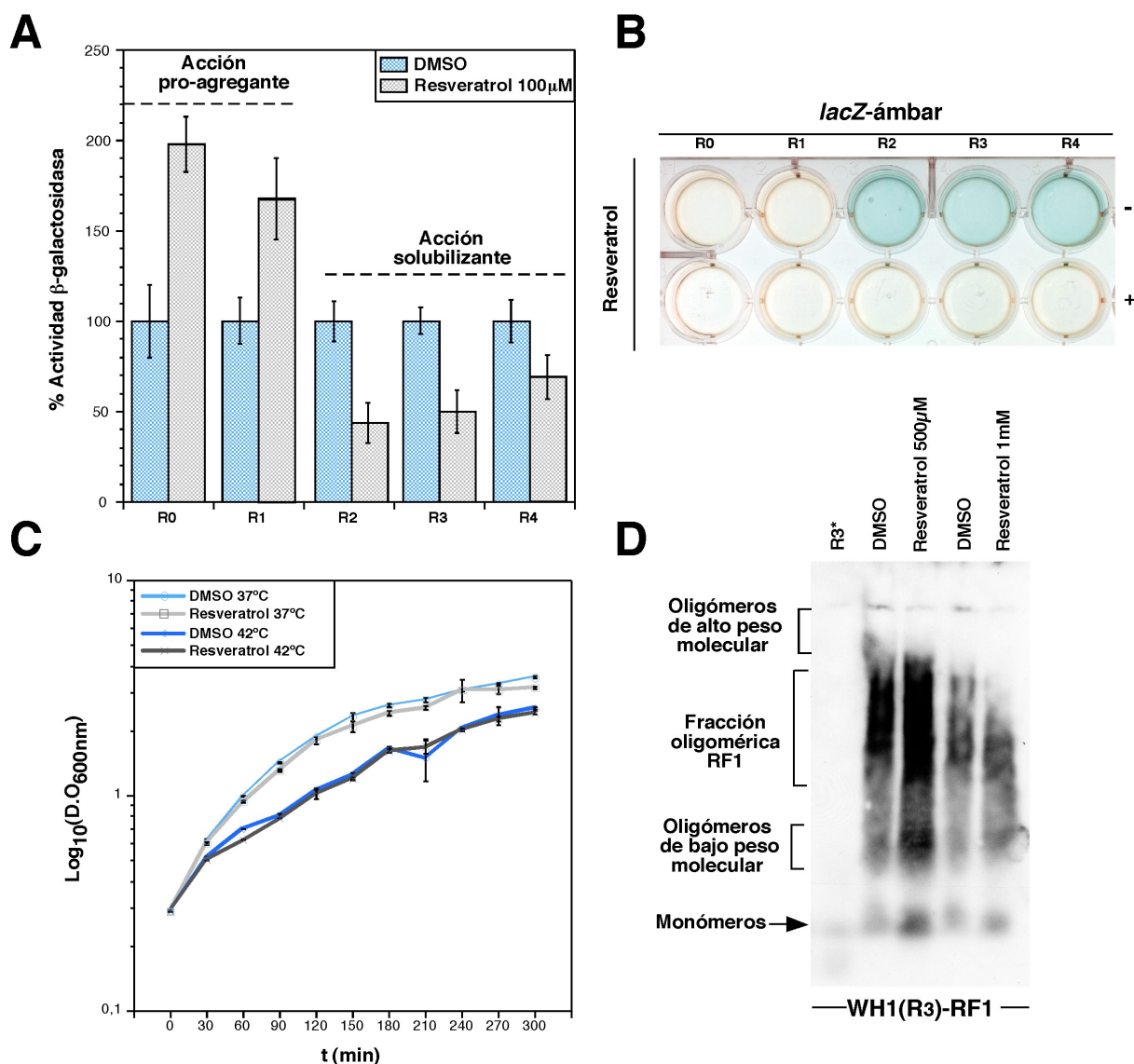


Figura 40: Ensayo de actividad β -galactosidasa tras 24h de inducción de las quimeras WH1(R0-4)-RF1 en combinación con el reportero *lacZ*-ámbar en presencia y ausencia de resveratrol **(A)**. El tratamiento con resveratrol disminuye la actividad β -galactosidasa en las quimeras WH1(R2-4)-RF1, apuntando a un efecto solubilizador/anti-agregativo específico del resveratrol sobre aquellas quimeras donde las repeticiones de la secuencia amiloidogénica de RepA estaban causando agregación de RF1. Sin embargo, en aquellas quimeras donde la agregación no era significativa, el tratamiento con resveratrol parecía potenciar la agregación de RF1, contribuyendo a un aumento de la actividad β -galactosidasa WH1(R0-1)-RF1. **(B)** Los resultados obtenidos se correlacionan con los observados en los ensayos fenotípicos de lectura corrida de codones de terminación prematuros, donde el tratamiento con resveratrol recupera el fenotipo incoloro de las células que expresan las quimeras en combinación con el reportero *lacZ*-ámbar. **(C)** Curvas de crecimiento a 37°C y 42°C en presencia y ausencia de resveratrol (100 μM) de células de *E. coli* MDS42 para valorar la toxicidad del compuesto. El tratamiento con resveratrol no afecta a la viabilidad de *E. coli*. **(D)** SDD-AGE sobre lisados de células MRA8Δ*lacZ* expresando la quimera WH1(R3)-RF1 (1mM IPTG, 3 h) en presencia y ausencia de resveratrol (500 μM, 1mM). El tratamiento con el compuesto disgrega los oligómeros de alto peso molecular a la vez que promueve un aumento de las fracciones monomérica y oligomérica de bajo peso molecular.

un efecto general sobre el metabolismo de *E. coli* K12, dado que no se produce una reducción de biomasa.

No obstante, teniendo en cuenta la cinética de síntesis y degradación de β -galactosidasa mostrada en la figura 36B, cabe la posibilidad de que la disminución en la actividad enzimática de la quimera WH1(R0)-RF1 en combinación con el reportero *lacZ*-WT sea consecuencia de un aumento generalizado en la solubilidad de las proteínas a 42°C derivada de la acción del resveratrol que promueva la degradación de la enzima de manera más eficiente que en ausencia del compuesto.

Además, con el fin de corroborar el efecto anti-agregante del resveratrol en las quimeras WH1(R2-4)-RF1 se llevó a cabo un análisis bioquímico mediante SDD-AGE a partir de lisados de células que expresaban la quimera WH1(R3)-RF1 crecidas en presencia y ausencia de resveratrol (500 μ M y 1mM) e inducidas con 1mM de IPTG. Los resultados obtenidos mostraron una reducción significativa de los oligómeros de alto peso molecular así como un aumento de la fracción monomérica y oligomérica de menor tamaño dependientes de la concentración de resveratrol empleada (Figura 40D). Este resultado confirmó que el efecto fenotípico sobre la coloración observado se debe, efectivamente, a un efecto solubilizador del polifenol en las quimeras en las que las repeticiones del péptido amiloidogénico de RepA-WH1 promueven la agregación de RF1.

VI. DISCUSIÓN

1. Co-agregación de variantes de RepA-WH1

1.1. Relación fenotipo-amiloidogénesis en variantes de RepA-WH1

Para valorar la capacidad de nucleación cruzada entre variantes de RepA-WH1 (WT, A31V y Δ N37), éstas se clonaron en dos series de vectores de expresión fusionadas a distintos reporteros fluorescentes (mRFP/YFP) y se co-expresaron en todas las combinaciones posibles. Los ensayos de expresión individual de las construcciones, mostraron que los fenotipos visualizados al microscopio para las distintas variantes y fusiones a mRFP o a YFP_{A206K} se mantenían independientemente del reportero fluorescente monomérico empleado: solubilidad para la fusión a RepA-WH1(WT) y agregación diferencial para A31V (multifocal) y Δ N37 (mono/bipolar) (Fernández-Tresguerres y col., 2010; Gasset-Rosa y col., 2014). Estos resultados indican que el fenotipo observado es dependiente, directamente, de la capacidad de agregación de las variantes A31V y Δ N37 y no de la proteína fluorescente a la que éstas se fusionen (Molina-García y Giraldo, 2014).

Sin embargo, cuando se caracterizó bioquímicamente mediante *Western-blot* la proteína presente en la fracción soluble y agregada para cada construcción, la cantidad de proteína WH1(WT) soluble fue mayor cuando se expresó fusionada a YFP (Figura 18B) que a mRFP (Figura 18A), donde se detectó una considerable fracción agregada. Por el contrario, se obtuvieron niveles de expresión relativa soluble/agregado (S/A) invertidos para las variantes WH1(A31V) y WH1(Δ N37), encontrándose ambas en su mayoría agregadas independientemente del vector o de la proteína de fusión empleados (Molina-García y Giraldo., 2014). La base de estas diferencias reside en la naturaleza de cada una de las variantes: la proteína RepA-WH1(A31V), en comparación con la proteína WH1(WT), es hiperamiloidogénica (Giraldo, 2007) mientras que la variante Δ N37 es un mutante metaestable de RepA-WH1 que presenta estabilidad marginal (Giraldo y col., 1998), por lo que ambas son propensas a la agregación. No obstante, y a pesar de que el fenotipo observado en el caso de RepA-WH1(WT) es fluorescencia difusa, el fraccionamiento bioquímico sugiere que este fenotipo característico de la variante silvestre podría corresponder, en realidad, a oligómeros susceptibles de ser sedimentados más que a proteína soluble, dado el carácter amiloide que, aunque menor que el de A31V,

presenta la proteína RepA-WH1(WT) (Giraldo, 2007). Así, cuando los niveles de la variante WT son bajos al expresarlos desde el p15/YFP la mayoría de la proteína permanecería soluble, mientras que mayores niveles de expresión (10 veces más desde el pRK2, Figura 18A) contribuirían a la oligomerización de la proteína, reduciendo la fracción soluble detectada en el análisis bioquímico (Figura 18C), pero sin alterar el fenotipo observado al microscopio por encontrarse el tamaño de dichos oligómeros por debajo del límite de resolución aquél. En este punto, es necesario destacar que los niveles de expresión obtenidos para el resto de las variantes fusionadas a YFP (A31V y Δ N37) fue siempre mayor que al fusionarlas a mRFP, lo que concuerda con un mayor número de copias del plásmido p15 en relación al pRK2, y por ende, una mayor cantidad de proteína. La causa de la reducción en los niveles de expresión de la fusión RepA-WH1(WT)-YFP no está clara. Para identificar posibles mutaciones en el módulo de expresión, se comprobó la secuencia de ADN en su totalidad en distintos clones siendo correcta en todos ellos. Además, para descartar posibles mutaciones en el resto del vector que pudiesen influir a la estabilidad del plásmido, se repitió la clonación hasta 3 veces, obteniendo siempre el mismo resultado. Una posibilidad es que dicha fusión afecte al plegamiento de la proteína y que su sobreexpresión lleve consigo asociada una proteólisis de la misma que, dado que no se detecta mediante *Western-blot*, debería estar produciéndose por el extremo N-terminal (degradando la etiqueta c-myc). Sin embargo, en el caso de las fusiones a A31V y Δ N37 dada su tendencia a agregar, el extremo amino-terminal de las mismas podría resultar protegido del ataque proteolítico.

1.2. Nucleación cruzada *in vivo* y gradación del potencial amiloide de las variantes de RepA-WH1: A31V> Δ N37>>WT

En los ensayos de co-expresión, únicamente se obtuvo fluorescencia difusa en la combinación WT-mRFP/WT-YFP. Sin embargo, el fraccionamiento bioquímico indica, de nuevo, un alto porcentaje de proteína agregada para ambas proteínas de fusión. En cuanto al balance entre solubilidad (S) y agregación (A), éste se mantuvo igual al obtenido tras la expresión individual de la fusión WH1(WT)-mRFP (S: 60%, A: 40% Figura 18B,19B), pero el porcentaje de proteína agregada en el caso de la fusión WH1(WT)-YFP aumentó más del doble (S: 55%, A: 45% Figura 19B) en comparación a su expresión individual (S: 75%, A: 25% Figura 18B) (Molina-García y Giraldo, 2014). Este resultado apoya la hipótesis de la presencia de oligómeros susceptibles de ser sedimentados pero con la apariencia de un

fenotipo soluble en la observación mediante microscopía de fluorescencia, e indica la capacidad de nucleación de los mismos, resaltando el potencial amiloide de la proteína WH1(WT), previamente descrito (Giraldo, 2007). Por su parte, las variantes con tendencia a agregar A31V y Δ N37 dominaron sobre la WT al inducir su agregación, siguiendo ésta el patrón característico de la variante con la que se co-expresó: bien en forma de agregados múltiples y dispersos, al co-expresarla con WH1(A31V), o bien en forma de cuerpos de inclusión mono o bipolares, al hacerlo con WH1(Δ N37), siendo A31V la variante más fuerte independientemente de sus niveles de expresión (Molina-García y Giraldo, 2014). Sea expresada desde el plásmido p15 o desde el pRK2, la variante A31V fue capaz de nuclear tanto a WH1(WT) (A: 100%; A: 40%, respectivamente) como a WH1(Δ N37) (Figura 19A). Esto no sucedió en el caso de la variante Δ N37: únicamente cuando los niveles de ésta son mayores (esto es, al expresarla desde el vector p15) que los de la variante WT se produce la nucleación de la segunda en los cuerpos de inclusión formados por WH1- Δ N37. Dado que WH1(Δ N37) carece del segmento amiloidogénico de RepA-WH1 (L₂₆VLCAASLID₃₄) (Giraldo, 2007), este resultado sugiere que la nucleación debe ocurrir a través de otra región de la proteína. Por lo tanto, la agregación promovida por WH1(Δ N37) podría considerarse como inespecífica, basada principalmente en interacciones hidrofóbicas de carácter general (Giraldo y col., 1998), al no estar mediada por la región amiloidogénica de WH1.

En el caso de los controles, co-expresando los distintos reporteros fluorescentes en combinación con la proteína de fusión del color complementario, ninguno de ellos co-agregó significativamente con las variantes de RepA (Figura 20). Es interesante destacar que en estas combinaciones las zonas ocupadas por el nucleóide o por los agregados de RepA carecen con frecuencia de marcaje fluorescente, sugiriendo que ambos reporteros podrían formar oligómeros de un tamaño suficiente como para presentar difusión reducida en las zonas ocupadas por el nucleóide bacteriano (Jun y Wright, 2010).

Estos resultados son compatibles con experimentos previos desarrollados *in vitro*, en los que proteína RepA-WH1(A31V) purificada *ex vivo* a partir de los agregados bacterianos, dirige el ensamblaje en fibras amiloides de moléculas de proteína soluble de la misma variante (A31V) y es capaz de dirigir la nucleación cruzada de agregados no fibrilares de la variante WT (Fernández-Tresguerres y col., 2010). En este sentido, es necesario destacar que, estudios recientes de resonancia magnética nuclear han demostrado que los agregados amiloides purificados de fuentes biológicas reproducen

sobre las moléculas de proteína soluble la misma conformación amiloide que adoptan originariamente (Frederick y col., 2014; Lu y col., 2013). La naturaleza de los agregados intracitoplásmicos de RepA-WH1 ha sido previamente caracterizada como amiloide mediante su unión al fluoróforo amiloidotrópico BTA-1 estableciéndose una gradación en la amiloidogenicidad de dos variantes conformacionales de A31V y de los agregados de $\Delta N37$: A31V_G>A31V_C>> $\Delta N37$ _{IB} (Gasset-Rosa y col., 2014).

Para explorar cualquier posible diferencia, a nivel bioquímico, entre las fracciones agregadas de las variantes WH1(WT) y WH1(A31V), lisados celulares expresando estas proteínas (independientemente o co-expresadas) se analizaron mediante SDD-AGE, una técnica ampliamente utilizada para la separación y detección de especies agregadas en priones de levadura (Bagriantsev y col., 2006) y adaptada en nuestro laboratorio para el estudio de los agregados amiloides de RepA-WH1 en *E. coli* (Gasset-Rosa y col., 2014; Molina-García y Gasset-Rosa, 2014). Además de los oligómeros previamente descritos para RepA-WH1(A31V) (Gasset-Rosa y col., 2014), se identificaron oligómeros de RepA-WH1(WT) distintos, tanto al expresarse individualmente como co-expresada con la variante A31V, con una movilidad electroforética menor que los oligómeros de la variante hiperamiloidogénica (Molina-García y Giraldo, 2014). Este resultado constituye la prueba bioquímica de que, efectivamente, y a pesar del fenotipo soluble observado mediante microscopía de fluorescencia, la fracción agregada de RepA-WH1(WT) está constituida por oligómeros de dicha proteína. Además, este resultado coincide con lo que ha sido establecido en el campo de priones de levaduras utilizando la técnica de SDD-AGE: Estirpes de priones con fenotipos débiles tienden a formar ensamblajes amiloides grandes, mientras que estirpes con fenotipos fuertes generan oligómeros amiloides de menor tamaño (Derdowski y col., 2010; Tanaka y col., 2006). Sin embargo, es necesario destacar que, aunque a partir de los resultados obtenidos, tanto por microscopía como mediante fraccionamiento bioquímico, es evidente que la co-expresión de distintas variantes de RepA-WH1 incrementa mutuamente su agregación según su grado de amiloidogenicidad, no ha sido posible demostrar su coexistencia en una especie oligomérica amiloide común mediante SDD-AGE. Esto podría reflejar una limitación de la técnica, diseñada para los priones de levadura, caracterizados por contener secuencias polares ricas en Q/N, dado que la agregación está dirigida por residuos principalmente hidrofóbicos en el caso de RepA-WH1 (Giraldo, 2007).

Por otra parte, la longitud de las bacterias que expresaban la variante WH1(A31V) fue significativamente mayor (al menos 1 μ m, Tabla 5) (Molina-García y Giraldo, 2014), signo característico del retardo en la división celular y por tanto de la toxicidad de los agregados (Lindner y col., 2008; Stewart y col., 2005; Gasset-Rosa y col., 2014). El aumento en la longitud celular es, asimismo, reflejo de la tendencia a la filamentación de las bacterias que expresan la variante hiperamiloidogénica (Fernández-Tresguerres y col., 2010; Gasset-Rosa y col., 2014).

En su conjunto estos sencillos experimentos de co-localización evidencian la capacidad del prionoide RepA-WH1(A31V) de inducir nucleación cruzada en el citoplasma de *E. coli*, es decir, de promover *in vivo* la formación y el crecimiento de partículas amiloides a partir de moléculas de variantes distintas de la misma proteína con menor amiloidogenicidad. Asimismo, gracias a los balances solubilidad/agregación, ha sido posible cuantificar la capacidad de nucleación, no solo entre variantes distintas de la misma proteína, sino también entre variantes idénticas fusionadas a distintos reporteros fluorescentes. En todos los casos se obtuvo un aumento en la fracción agregada de la proteína indicando la nucleación de moléculas solubles sobre los agregados preformados, confirmando así la capacidad de transmisibilidad molecular *in vivo* del prionoide RepA-WH1(A31V) (Molina-García y Giraldo, 2014), previamente descrita *in vitro* (Fernández-Tresguerres y col., 2010). Estos ensayos permiten, además, diferenciar de una manera sencilla agregados amiloides propiamente dichos de cuerpos de inclusión bacterianos que, a pesar de tener cierto carácter amiloide (Carrió y col., 2005; Wang y col., 2008), difieren de los primeros en localización subcelular, número, toxicidad y transmisibilidad mediada por chaperonas (Fernández-Tresguerres y col., 2010; Gasset-Rosa y col., 2014). Por lo tanto, teniendo en cuenta la reducida toxicidad, localización extracelular y relajada especificidad en cuanto a nucleación cruzada de otros amiloides bacterianos (Sivanathan y Hochschild, 2012, 2013), RepA-WH1 se alza como un sistema modelo minimalista bacteriano completamente sintético, que permite el estudio de eventos de agregación cruzada intracelular entre péptidos y proteínas con distinto potencial amiloidogénico, uno de los puntos de mayor interés y relevancia en la actualidad en el estudio de la etiología y patogénesis de las amiloidosis humanas (Morales y col., 2013).

2. Caracterización de las vías de toxicidad del prionoide RepA-WH1(A31V)

La combinación de estudios de transcriptómica diferencial, el análisis del proteoma coagregado y distintos ensayos fisiológicos nos ha permitido esbozar durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral la cadena de eventos conducentes a la muerte celular bacteriana causada por el prionoide RepA-WH1 en su variante hiperamiloidogénica A31V (Figura 41), siendo esta la primera vez que se aborda de manera global el estudio de la toxicidad amiloide en bacterias. Es necesario destacar que todos los efectos descritos se basan en la substracción de aquellos causados por la variante $\Delta N37$, caracterizada por formar cuerpos de inclusión convencionales, con morfología diferente y de toxicidad más reducida (Giraldo y col., 1998; Gasset-Rosa y col., 2014), siendo la respuesta a $\Delta N37$, por tanto, representativa del proceso general de agregación de proteínas, pero no específica de la amiloidogénesis.

2.1. Daño en la membrana interna: Evento primario de la citotoxicidad causada por el prionoide RepA-WH1(A31V)

La proteinopatía causada por el prionoide RepA-WH1(A31V) comenzaría, en consonancia con datos del laboratorio obtenidos por la Dra. Fernández sobre modelos citomiméticos de vesículas lipídicas *in vitro*, con un daño en la membrana interna producido por los agregados amiloides: la unión de RepA-WH1(A31V) a fosfolípidos ácidos que forman parte de las vesículas, similares a los lípidos de la membrana interna de bacterias y mitocondrias (Camilleri y col., 2013), promueven la amiloidogénesis de la proteína y la liberación de moléculas fluorescentes desde el lumen de las vesículas, probablemente a través de la formación de poros en la bicapa de las mismas, tal y como ha sido descrito para otras proteínas de naturaleza amiloide (ver Introducción, sección 3).

La pérdida de la integridad de la membrana conlleva la disrupción del gradiente protón motriz, según muestra la reducción en el transporte activo de gentamicina en el caso de las células que expresan el prionoide (Figura 28). A su vez, la alteración de la membrana interna dificultaría la correcta actividad de las deshidrogenasas de membrana (incluyendo el complejo I: NdhI/NuoA-N), que se encuentran reprimidas en nuestro análisis transcriptómico (Figura 22). Los ensayos de transcriptómica diferencial muestran que, bajo nuestras condiciones experimentales, se produce además una represión neta de

los genes que codifican para el citocromo *bd-I* (*cydAB*), una de las oxidasas terminales principales de la cadena respiratoria de *E. coli*. Por su parte, la oxidasa terminal alternativa (citocromo *bo'/cyoA-E*) requiere del bombeo de protones a través de la membrana, con lo cual no es esperable que su operatividad sea completa, dada la disrupción de la membrana interna causada por el prionoide. Esta disfunción en las oxidasas terminales impulsaría la reducción neta observada en el consumo de oxígeno de las bacterias que expresan RepA-WH1(A31V) (Figura 26), resultando en un aumento en la concentración de oxígeno disponible para producir la inactivación de Fnr (Federowicz y col., 2014). Esto podría explicar el por qué, a pesar de la inactivación dependiente de oxígeno en condiciones de aerobiosis del centro ferro-sulfuroso presente en Fnr, la expresión de *fnr* es la más alta de entre todos los genes cuya transcripción está alterada a tiempos cortos. En estas condiciones, hasta 68 genes de los directamente regulados por Fnr mostraron su expresión alterada en el análisis transcriptómico, mientras que esta cifra cae a 23 y 14 genes a tiempos medios y largos, respectivamente. Por lo tanto, Fnr es, probablemente, el factor transcripcional responsable de desencadenar la respuesta al estrés generado por el prionoide RepA-WH1(A31V) en las células de *E. coli*.

2.2. La expresión de A31V reduce los niveles de ATP y aumenta la sensibilidad a H₂O₂

En una situación de bajo gradiente protón motriz debido a una alteración en la membrana, la respiración sería esencialmente dependiente de la NADH deshidrogenasa alternativa, Ndh-II, que se encuentra sobreexpresada. Esta deshidrogenasa es, de hecho, la más activa en *E. coli* en aerobiosis (Messner e Imlay, 1999). Sin embargo, precisamente debido a su incapacidad para generar un gradiente protón motriz, Ndh-II es menos eficiente que Ndh-I en la generación de ATP (Unden y Bongaerts, 1997), tal y como hemos corroborado experimentalmente. Los resultados obtenidos muestran una disminución progresiva de los niveles de ATP en las células que expresan el prionoide en comparación con los de las células control (Figura 27). De esta manera, la síntesis de ATP, más que depender de la terminación normal de la cadena respiratoria (Complejo V: ATPasa F1/F0), dependería de la vía glicolítica que convierte ADP en ATP vía expresión de la piruvato kinasa I, PykF. No obstante, la coagregación de PykA (piruvato kinasa II) con los agregados amiloides de RepA-WH1(A31V) (Figura 23) contrarrestaría en parte esta alternativa, contribuyendo también a la reducción de ATP valorada experimentalmente

(Figura 27). Además de la vía glicolítica, la reserva de nucleótidos trifosfato debería poder regenerarse, en parte, gracias a la sobreexpresión de la nucleótido difosfato kinasa Ndk. Esta enzima cataliza la síntesis, dependiente de ATP, de (desoxy)ribonucleótidos trifosfato a partir del correspondiente precursor difosfato (Figura 22).

Un efecto indeseado derivado de la actividad de Ndh-II es la generación de grandes cantidades de ROS (peróxido y superóxido) (Messner e Imlay 1999; Seaver e Imlay 2004). En condiciones normales, la alquil-peróxido reductasa (Ahp) se encarga de la detoxificación del peróxido de hidrógeno. Sin embargo, cuando las concentraciones extracelulares de H₂O₂ son elevadas ($\approx 20 \mu\text{M}$), el sistema se satura y la eliminación de H₂O₂ pasa a depender de las catalasas celulares vía su activación transcripcional promovida por OxyR (Imlay 2008). Mientras que las superóxido dismutasas (SodAB, encargadas de realizar el paso de radical superóxido a peróxido de hidrógeno) y la alquil-hidroperóxido reductasa (Ahp) no mostraron alteraciones en sus niveles de expresión en nuestro estudio transcriptómico y están ausentes en el proteoma coagregado con el prionoide RepA-WH1(A31V), las catalasas se encuentran bien hiper-reprimidas (KatG) o coagregadas con A31V (KatE), convirtiendo así la sobreproducción de H₂O₂ en la principal fuente de estrés oxidativo, tal y como evidencian los datos experimentales (Figuras 29-31). Por su parte, la reducción en los niveles de KatG podría ser consecuencia de la sobreexpresión de la glutatión peroxidasa BtuE (Arenas y col., 2011) (Figura 22) y/o la agregación de OxyR, principal activador transcripcional de genes de respuesta a estrés oxidativo (Aslund y col., 1999) (Figura 23). Los resultados del ensayo de sensibilidad a ROS, muestran que las células que expresan el prionoide RepA-WH1(A31V) son más sensibles a H₂O₂, ya que el área del halo de inhibición del crecimiento que se genera es mayor que para las células control y para las células que expresan ΔN37 (Figura 29). Además de valorar la hipersensibilidad a H₂O₂ hemos corroborado que la sobreexpresión Ndh-II inducida por RepA-WH1(A31V) es, efectivamente, la principal fuente de peróxido de hidrógeno en las células que expresan el prionoide, mediante la cuantificación de la mayor sensibilidad a dicho radical en fondos genéticos *ndh*⁺ en comparación con un fondo Δndh (Figura 30).

2.3. La expresión del mutante A31V reduce la captación de hierro y con ello sus niveles intracelulares

Otra respuesta notable derivada de la expresión del prionoide RepA-WH1(A31V) es la sobreexpresión neta de los genes codificantes para sideróforos. Éstos componen un

arsenal de quelantes de hierro que deben ser exportados al medio extracelular y posteriormente internalizados para completar su función: proveer de hierro al citoplasma celular (Andrews y col., 2003). Sin embargo, el intento de las células que sufren la amiloidosis inducida por el prionoide RepA-WH1(A31V), de compensar el déficit de hierro mediante la expresión de su batería de sideróforos es, probablemente, un proceso fútil, debido al fallo subyacente en el transporte activo a través de la membrana, tal y como sugiere la reducción de los niveles totales de hierro intracelular en comparación con los exhibidos por células libres del prionoide (Figura 32). Esto explicaría el porqué se reprime la síntesis de las enzimas que requieren hierro como cofactor, lo cual está a su vez asegurado vía sobreexpresión del ARN antisentido RhyB (Massé y col 2005; Salvail & Massé 2011) (Figura 22). Otra fuente alternativa del metal la constituye su reciclaje procedente del desensamblaje de los centros ferro-sulfurosos (Fe-S). Este proceso, potenciado por la condición de estrés oxidativo generalizada en el citoplasma de las células que expresan el prionoide, se intenta contrarrestar mediante la sobreexpresión de chaperonas implicadas en su ensamblaje (IscX, HscAB, SufA) (Jang e Imlay, 2010; Vinella y col., 2013; Ezraty y col., 2013) (Figura 22).

Otras ferro-enzimas mononucleares como la péptido deformilasa (Def) son asimismo dianas preferenciales del H_2O_2 (Anjem e Imlay 2012), situación a la que las células responden con un aumento en la expresión de enzimas que utilizan manganeso en su centro activo como cofactor (MntR, NrdeF) (Martin e Imlay 2011) (Figura 22).

2.4. Generación del radical hidroxilo: “Punto de no retorno” en la amiloidosis causada por RepA-WH1(A31V)

En la etapa final de esta proteinopatía amiloide sintética, la concurrencia de hierro libre y H_2O_2 en el citoplasma de *E. coli* resultaría en la generación del radical hidroxilo vía reacción de Fenton. La formación del radical hidroxilo conlleva una oxidación masiva de lípidos, proteínas y ADN, produciendo genotoxicidad y arresto de la división celular. En relación a este último punto, es necesario destacar que según nuestro análisis proteómico FtsZ, el regulador central de la división celular en *E. coli*, es la proteína con el mayor valor de co-agregación con A31V (Natale y col., 2013), lo que explicaría por qué las células que expresan el prionoide filamentos como consecuencia de la inhibición de la citocinesis (Gasset-Rosa y col., 2014). Los resultados del análisis transcriptómico muestran un último intento por parte de las células de contrarrestar este efecto, mediante la sobreexpresión

de múltiples enzimas implicadas en vías de respuesta a estrés oxidativo (IscX, HscAB, SufA) (Jang e Imlay, 2010; Vinella y col., 2013; Ezraty y col., 2013) y osmótico (KdpC, Ugd, PutA) (Gunasekera y col., 2008), así como proteínas implicadas en mecanismos de reparación del ADN (DeoA, Udk, HolBE, RecQR, RarR, Nth) (Aravind y col., 1999) y división celular (FtsBIK, MrdAB, MurG) (Natale y col., 2013) (Figura 22). No obstante, esta respuesta terminal resulta inútil dado que finalmente se produce la muerte celular.

2.5. RepA-WH1(A31V): Un sistema modelo de amiloidosis a nivel mitocondrial

La secuencia de eventos descrita para la amiloidosis producida por el prionoide RepA-WH1(A31V) en *E. coli* presenta algunos puntos en común con respuestas fenotípicas que esta bacteria emplea para hacer frente al estrés oxidativo (Lee y col., 2009), otro tipo de daños como el producido por pH ácido (Weber y col., 2005), choque térmico (Josefczuk y col 2010), estrés osmótico (Weber y col., 2005; Shabala y col., 2009), elevada presión (Malone y col., 2006), privación de nutrientes (Josefczuk y col 2010), escasez de hierro (Folsom y col., 2014) y tratamiento con antibióticos (Foti y col., 2012). Probablemente, el modo de acción más cercano al propuesto aquí para la proteinopatía intracelular causada por el prionoide RepA-WH1(A31V) se encuentre en los péptidos antimicrobianos catiónicos, que al igual que los amiloides, tienen como diana la membrana celular y desencadenan una respuesta similar a la producida por las especies reactivas de oxígeno.

Como se ha descrito en la introducción, uno de las dianas preferenciales en los procesos de amiloidosis son las mitocondrias. Dado el origen filogenético bacteriano de dicho orgánulo, que fueron α -proteobacterias endosimbiontes (Gray, 2012), no es de extrañar que la respuesta citotóxica aquí dilucidada para el prionoide RepA-WH1(A31V) en *E. coli* comparta gran parte de las características descritas en mitocondrias de células de mamífero en un amplio espectro de enfermedades neurodegenerativas (Lin y Beal 2006). La mitocondria proporciona poder energético a las células eucariotas al generar ATP vía fosforilación oxidativa, habiéndose caracterizado alteraciones de su funcionalidad ligadas a procesos de amiloidosis. La implicación de la mitocondria en los procesos de amiloidosis ha sido descrita para α -sinucleína (Haelterman y col., 2014), A β y Tau (García-Escudero y col., 2014) y huntingtina (Costa y Scorrano 2012), comprendiendo los

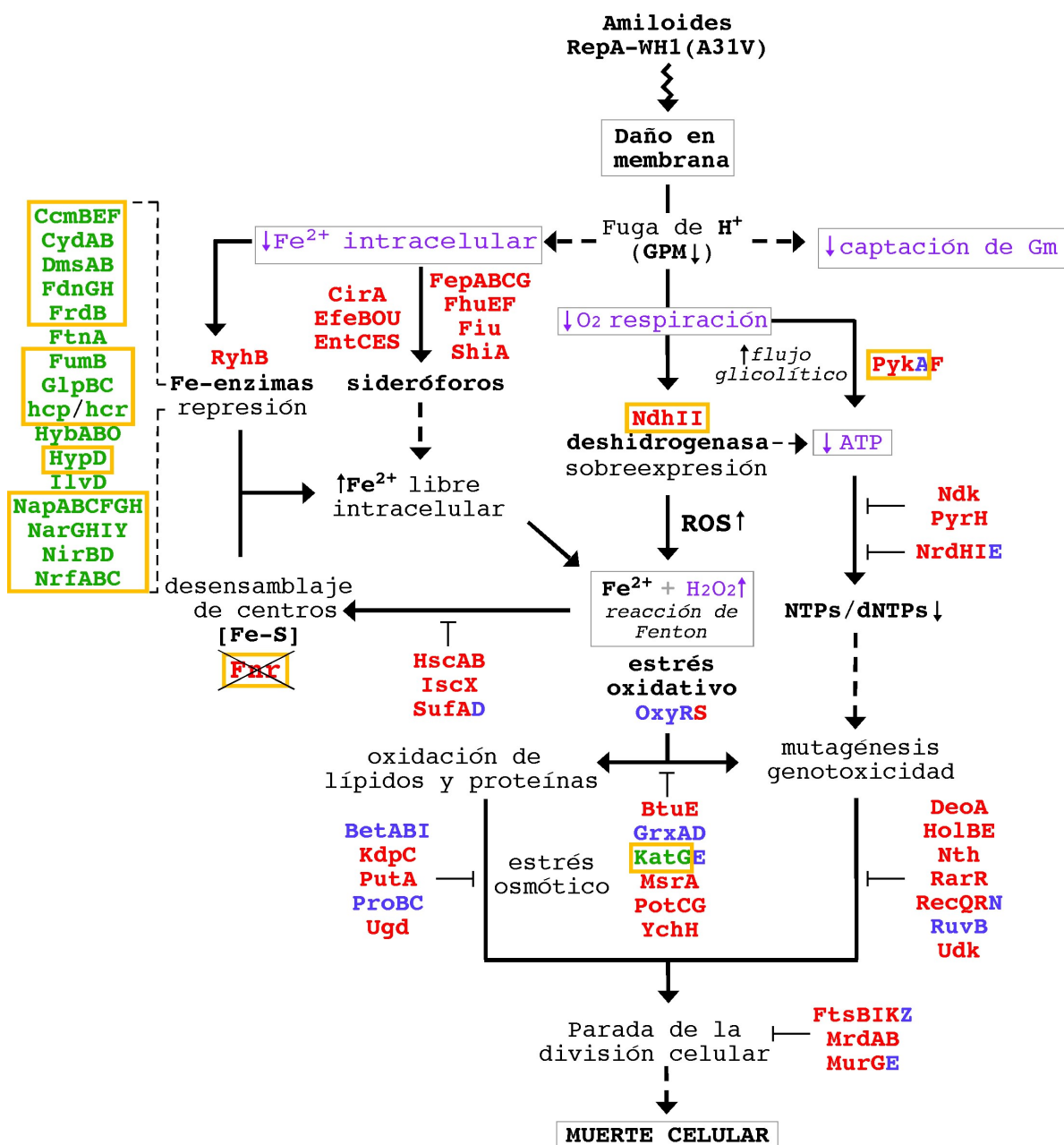


Figura 41: Modelo de toxicidad propuesto para el prionoide RepA-WH1(A31V): El daño en membrana producido por los agregados amiloides induciría la pérdida del gradiente protón motriz, reduciendo tanto la respiración aerobia, vía alteración de la cadena de transporte de electrones, como el transporte a través de membrana, incluyendo los mecanismos de captación de hierro. La alteración en la cadena de transporte de electrones conlleva una disminución de los niveles de ATP a lo que también contribuye la sobreexpresión de la deshidrogenasa alternativa Ndh-II. Por su parte, la disminución de los niveles de hierro intracelular se intentan contrarrestar mediante tres mecanismos: i) Sobreexpresión de genes codificantes de sideróforos, ii) represión de ferro-enzimas y iii) desensamblaje de los centros ferro-sulfurosos, contribuyendo todos ellos a un aumento del hierro libre intracelular. La concurrencia en el citoplasma de hierro libre junto con ROS derivadas de la actividad de la deshidrogenasa Ndh-II, conlleva la generación del radical hidroxilo vía reacción de Fenton. De esta manera, el radical hidroxilo promueve la oxidación de lípidos y proteínas, un aumento de la mutagénesis y genotoxicidad. Esto conlleva, en último término, el arresto de la división celular y la muerte de las bacterias. Se representan en rojo y verde las proteínas cuyos genes se encontraron sobreexpresados y reprimidos respectivamente. En azul se muestran las proteínas coagregadas con A31V y en morado las observaciones experimentales. Por último los recuadros amarillos muestran genes regulados por Fnr, probablemente el factor transcripcional implicado en la respuesta de *E. coli* a la citotoxicidad causada por RepA-WH1(A31V).

mayores signos de neurodegeneración: i) generación masiva de ROS, ii) disrupción del gradiente proton motriz y iii) la consecuente reducción de la síntesis de ATP (Lin y Beal 2006), tal y como ocurre en el caso del prionoide bacteriano RepA-WH1(A31V).

Asimismo, se han descrito alteraciones en la morfología y la dinámica del orgánulo (Itoh, 2012) así como en su interacción con el retículo endoplasmático (Hedskog y col., 2013). Recientemente, la mitocondria ha sido implicada, también, en la retención asimétrica de agregados proteinopáticos en la célula madre durante la división celular en levaduras, contribuyendo así a la pérdida de los mismos en la descendencia (Zhou y col., 2014). El trabajo pionero desarrollado en el laboratorio de Leroy Hood sobre la proteína PrP^{Sc} demostró, además, afectación del metabolismo energético mitocondrial (Hwang y col 2009). Asimismo, estudios proteómicos posteriores describieron la presencia mayoritaria de factores mitocondriales co-agregados con proteínas amiloides (Olzscha y col., 2011).

En el caso concreto del péptido A β , su amiloidogénesis parece ocurrir en la membrana externa mitocondrial, en particular en los puntos donde contacta con el retículo endoplásmico (Hedskog y col., 2013). Además, en el caso de la proteína Tau y α -sinucleína el aumento de la misma depende del fosfolípido específico mitocondrial y bacteriano, cardiolipina (Camilleri y col., 2013). La disrupción de la membrana interna mitocondrial causada por SOD-1 y α -sinucleína ha sido asimismo descrita, con la consecuente disipación del gradiente protón motriz (Oladzad y col., 2013).

A pesar de que las células de mamífero carecen de Ndh-II, se ha descrito como A β , Tau y α -sinucleína inducen la generación de ROS por el complejo I (Ndh-I), y la disfunción del transporte a través de membranas, lo que implica una reducción en la síntesis de ATP (Bobba y col., 2013; Sarafian y col., 2013). Esto es consecuencia de una respiración reducida, contrarrestada con un aumento del flujo glicolítico (efecto Warburg) (Newington y col., 2012), al igual que sucede para las células que expresan el prionoide. Así, en los cerebros de pacientes de Alzheimer y Parkinson existen elevados niveles de marcadores de daño oxidativo incluyendo oxidación de lípidos, proteínas y ADN (Maccioni y col., 2008).

Del mismo modo que en el caso del prionoide RepA-WH1(A31V) se han descrito alteraciones en el metabolismo del hierro en la enfermedad de Parkinson, Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica (Li y col., 2010). Un incremento neto del hierro libre ha sido detectado en las mitocondrias de células de individuos afectados de Parkinson y

Alzheimer (Gao y Chang, 2014). Aparte de estas proteinopatías amiloides, la amiloidosis causada por RepA-WH1(A31V) también comparte muchas similitudes con las complejas vías de citotoxicidad descritas para el prion de mamíferos PrP. Así la generación de ROS en células gliales por la NAD(P)H-oxidasa (NOX2) en la cadena respiratoria puede inducirse bien por la propia PrP^{Sc} o por anticuerpos monoclonales cuya unión al dominio globular de PrP mimetiza la neurotoxicidad producida por PrP^{Sc} (Sonati y col., 2013; Sorce y col., 2014). Ésta, a su vez, es contrarrestada mediante anticuerpos contra el extremo N-terminal de PrP o, al igual que en el caso de RepA-WH1(A31V), suplementando el medio con ácido ascórbico, quelante de ROS (Herrmann y col., 2015). Por otro lado, la expresión de genes implicados en la homeostasis del hierro, fue descrita como un nuevo módulo funcional en la enfermedad priónica en el análisis transcriptómico más completo publicado hasta el momento (Hwang y col., 2009).

Los datos presentados en esta Tesis Doctoral sobre las vías moleculares de la proteinopatía causada por el prionoide RepA-WH1(A31V) trazan un esquema mínimo para las enfermedades amiloides, focalizado en la mitocondria, que presenta como principales disfunciones básicas: i) la alteración de la membrana por parte de agregados amiloides, ii) un transporte transmembrana ineficiente y iii) la disfunción de la respiración aerobia, con la subsiguiente generación de ROS. Consecuentemente, este modelo bacteriano proporciona una plataforma versátil sobre la que validar experimentalmente intervenciones potencialmente relevantes para poder actuar, en su caso, sobre los procesos de amiloidosis en sistemas más complejos en los que las mitocondrias se ven afectadas.

3. Prionoides quimera WH1(R0-4)-RF1

3.1. Los niveles de las quimeras WH1-Rn-RF1 son similares a los de la proteína RF1(WT) en condiciones fisiológicas

La estirpe elegida para la realización de los ensayos fue *E. coli* MRA8 (Zhang y col., 1994), termosensible para el gen *prfA* (R137P) (Rydén e Isaksson, 1984; Zhang y col., 1994) que codifica RF1. La elección de esta cepa estuvo condicionada por la descrita esencialidad de RF1 en *E. coli* en el momento en el que se diseñó este proyecto (Gerdes y col., 2003). Sin embargo, en la actualidad existen mutantes de delección de RF1 viables que podrían solventar algunos de los problemas derivados del uso de MRA8, como se discutirá

más adelante (Heinemann y col., 2012; Johnson y col., 2012; Lajoie y col., 2013). La estirpe MRA8 no es viable, por tanto, a 42°C en ausencia de complementación por RF1 silvestre.

Los ensayos de complementación mostraron que la quimera WH1(R3)-RF1 era capaz de complementar el crecimiento al inducir su expresión en un rango de concentraciones de IPTG entre 0,01 y 0,05 mM (Figura 34). La ausencia de variación en la complementación del crecimiento en rangos de concentración superiores a 0,05mM sugería que la concentración fisiológica de RF1 era baja, por lo que se empleó una concentración intermedia de 0,02 mM de IPTG para la inducción de las quimeras a 42°C. Este resultado concuerda con los obtenidos por Mora y colaboradores en 2003, en los que la complementación del crecimiento en otra estirpe (US486) con la misma mutación termosensible para *prfA* (Rydén e Isaksson, 1984) se obtenía al inducir RF1 (WT) con niveles de IPTG comprendidos entre 0-0,1 mM. Ambos resultados sugieren el uso de concentraciones bajas de inductor para obtener niveles de expresión de RF1 comparables a los fisiológicos. Los niveles de RF1 por célula, *in vivo*, fueron determinados por Adamski y colaboradores en 1994 estimándose una variación de entre 1200 a 4900 moléculas por célula a medida que aumenta la tasa de crecimiento, cinco veces menos que en el caso de RF2 (5900-24900 moléculas por célula) (Adamski y col., 1994).

3.2. Prionoides quimera WH1(R_n)-RF1 : Un nuevo ensayo sintético para la detección *in vivo* de secuencias con potencial amiloide en *E. coli*

Teniendo en cuenta el diseño de las quimeras y la hipótesis de partida, la aparición o no de color ocurriría de manera inversa al sistema descrito en levaduras. En este caso, si la fusión de RF1 a las repeticiones WH1(R_n) promovía la agregación del factor de terminación de la traducción, éste sería incapaz de detener la síntesis proteica en el codón ámbar prematuro presente en el gen *lacZ*, sintetizándose un producto completo y funcional, la enzima β-galactosidasa. De esta manera, en presencia de X-Gal las colonias exhibirían coloración azul. Por el contrario, si las fusiones a las repeticiones peptídicas no condujesen a la agregación de las quimeras WH1(R_n)-RF1 éstas serían funcionales y, por tanto, capaces de detener la traducción del gen *lacZ* en el codón ámbar prematuro, dando lugar a colonias blancas en presencia de X-Gal.

Los resultados obtenidos en los ensayos de lectura corrida del codón de terminación prematuro tanto en medio sólido (LB-agar) como líquido (M9+CAA), evidenciaron la capacidad de las quimeras WH1(R2-4)-RF1 de reducir la eficacia de terminación de la

traducción en dicho codón, al dar lugar a colonias de coloración azul al combinarse con el reportero *lacZ*-ámbar a 42°C (Figura 35A yB). Por el contrario, las quimeras WH1(R0-1)-RF1 se mostraron funcionales en las mismas condiciones, obteniéndose colonias blancas.

Asimismo, los niveles de actividad β -galactosidasa obtenidos a 42°C para las células que expresaban las quimeras WH1(R2-4)-RF1 en combinación con el reportero ámbar, relativos al 100% de la actividad, determinada para cada quimera en combinación con el reportero *lacZ*-WT, fueron significativamente mayores que los obtenidos para las quimeras WH1(R0-1)-RF1 en las mismas condiciones. Este resultado confirmaba de manera cuantitativa el fenotipo de coloración observado (Figura 35C).

Estos resultados indican que la capacidad de promover la lectura corrida del codón de terminación UAG, presente en el reportero *lacZ*-ámbar, es dependiente de la presencia de repeticiones del péptido amiloidogénico de RepA-WH1, siendo 2 el número mínimo de repeticiones de la secuencia que se requieren para obtener un fenotipo atribuible a la agregación del factor, al igual que ocurría en los ensayos de complementación del fenotipo [PSI⁺] por las repeticiones WH1(R_n) en *S. cerevisiae* (Gasset-Rosa y Giraldo, 2015)

La cinética de actividad β -galactosidasa realizada con la quimera WH1(R2)-RF1 en combinación con el reportero *lacZ*-WT (Figura 36B), puso de manifiesto un retardo en la síntesis y la degradación de la enzima a 42°C. Este efecto podría deberse, en parte, al crecimiento a 42°C, ya que la temperatura afecta al proceso de síntesis, plegamiento y agregación de proteínas que podrían ser esenciales para la viabilidad celular (Kaczanowska y Rydén-Aulin, 2004; Rydén e Isaksson, 1984). Sin embargo, el resultado observado debe ser consecuencia de una combinación de la temperatura y la presencia de repeticiones del péptido amiloidogénico de RepA-WH1(A31V), ya que la disminución de la actividad β -galactosidasa obtenida (en todos los casos a 42°C) no es comparable entre las quimeras WH1(R0-1)-RF1 y WH1(R2-4)-RF1 en combinación con el reportero *lacZ*-WT (Figura 36A). Esto sugiere un efecto de la presencia de repeticiones sobre la maquinaria de síntesis y degradación de proteínas. La agregación del factor, y como consecuencia la disminución de los niveles de RF1 disponibles para ejercer su función, inducirían a un mayor número de ribosomas a entrar en pausa sobre los ARNm cuyo codón de parada fuese UAG (Kaczanowska y Rydén-Aulin, 2004; Rydén e Isaksson, 1984). En el genoma de *E. coli* se ha estimado que estos genes suponen un 7% del total (Nakamura y col., 2000). La pausa indebida en los codones UAG induciría la generación de complejos de traducción sin codón de terminación (*non stop translation complexes*) que son reconocidos por

tmRNA-SmpB (Keiler, 2008; Moore y Sauer, 2007), un sistema de control de calidad durante la síntesis proteica que recicla los ribosomas en pausa y marca las proteínas que no se han sintetizado de manera completa para su degradación proteolítica, en un proceso denominado *trans*-traducción (Keiler, 2008). El tmRNA (*transfer messenger RNA*), es una molécula de ARN estable, que funciona durante el reciclado de ribosomas como ARN transferente y mensajero del péptido SsrA (Keiler y col., 1996; Moore y Sauer, 2007). Éste constituye una etiqueta reconocible por proteasas, promoviendo así la degradación de proteínas sintetizadas de manera incorrecta (Choy y col., 2007; Gottesman y col., 1998; Herman y col., 1998). Además de los ARNm carentes de codón *stop*, existen otros sustratos para el proceso de *trans*-traducción (Hayes y col., 2002a,b; Roche y Sauer, 1999) siendo uno de ellos la lectura corrida de codones de terminación (Abo y col., 2002; Ueda y col., 2002).

Asimismo, existen otros mecanismos de regulación de la traducción bacteriana complementarios al sistema tmRNA-SmpB: a) la proteína ArfA actúa únicamente cuando la maquinaria de *trans*-traducción no está presente (Garza-Sánchez y col., 2011) y promueve, vía reclutamiento de RF2 en los complejos de traducción sin codón de terminación, la hidrólisis del peptidil-ARNt (Keiler y Feaga, 2014); b) la proteína ArfB, para la que se ha propuesto una posible actividad peptidil-tRNA hidrolasa (Hayes y Keiler, 2010).

Todos los ejemplos descritos anteriormente generan complejos de traducción no productivos que pueden secuestrar ribosomas reduciendo su disponibilidad y limitando la síntesis de otras proteínas de la célula (Keiler y Feaga, 2014). En nuestro sistema, este tipo de complejos se formarían tanto en los mensajeros cuyo codón de terminación fuese UAG, 321 genes en el genoma de *E. coli* (Lajoie y col., 2013), siendo 7 de ellos esenciales (Heinemann y col., 2012), como en buena parte de los codones de terminación UAA y en el ARNm del reportero *lacZ*-ámbar, contribuyendo al efecto observado en la síntesis y degradación de β -galactosidasa. Para valorar el papel de estos mecanismos de control en nuestro sistema, se intentó, hasta 6 veces y con dos estrategias distintas, la delección del gen que codifica a tmRNA en la estirpe MRA8 Δ *lacZ*, sin éxito. Considerando que dicha delección es viable en *E. coli*, dado que no es un gen esencial (Keiler y Feaga, 2014; Munavar y col., 2005), este resultado podría indicar que en fondo genético *prfA*^{ts} la delección de tmRNA no es factible debido a la disfunción de RF1. Otros autores obtuvieron resultados similares al intentar deleccionar *prfA* en un fondo Δ tmRNA, siendo dicha

combinación sintética letal en *E. coli* (Johnson y col., 2011). Este resultado concuerda, además, con el mecanismo propuesto por Janssen y Hayes (2009), en el que atribuyen a RF1 la capacidad de reciclado de ribosomas en estirpes $\Delta tmRNA$.

En cuanto a los niveles absolutos de actividad β -galactosidasa detectados, sus bajos valores podrían atribuirse a distintas causas:

i) La primera y principal, junto con la inducción de los mecanismos reguladores descritos anteriormente, es la **ausencia de un ARNt supresor del codón ámbar**: la mayoría de los sistemas en los que se ha estudiado la capacidad de lectura corrida a nivel fisiológico en distintos organismos utilizan ARNt supresores, ya sean naturales o modificados, para la utilización de aminoácidos no naturales (Heinemann y col., 2012; Johnson y col., 2011; Lajoie y col., 2013), que reconocen el codón de terminación y, en lugar de detener la síntesis proteica, incorporan el aminoácido codificado en su anticodón, continuando la elongación de la cadena polipeptídica. En estos sistemas, la valoración de la capacidad de lectura corrida es inversamente proporcional a la concentración de RF capaz de competir por la unión al sitio A del ribosoma con el ARNt supresor (Bertram y col., 2001). Esto da una idea de la afinidad de los RFs por los codones de terminación en distintos contextos genéticos. De ahí que la capacidad de lectura corrida varíe dependiendo del ARNt supresor empleado y de la posición del codón de parada en distintos puntos de un mismo gen reportero (Dahlgren y Rydén-Aulin, 2000; Johnson y col., 2011; Rydén e Isaksson, 1984).

En nuestro caso, y según la hipótesis de partida, el evento de lectura corrida debía ser consecuencia directa de la reducción de los niveles de RF1 por agregación del mismo y no por competición de las quimeras con un factor externo. Por esta razón, la estirpe MRA8 no fue transformada con ningún plásmido que portase un ARNt supresor capaz de reconocer el codón de terminación ámbar presente en el reportero *lacZ*, con lo que la síntesis de β -galactosidasa es dependiente del reconocimiento del codón de parada por parte de un ARNt supresor natural. Existen dos tipos de ARNt supresores naturales: a) los que reconocen el codón de terminación de manera específica por mutación en su anticodón; y b) aquéllos que reconocen de manera errónea un codón de terminación por apareamiento incorrecto entre las bases del tercer nucleótido del codón de terminación (Bertram y col., 2001). Este segundo caso sería el más probable en nuestro sistema, en el que la valoración de la actividad se da a tiempos cortos de la inducción de los RF quimera propensos a la

agregación y, dado que depende de un evento de apareamiento erróneo, su baja frecuencia explicaría el bajo nivel de actividad β -galactosidasa detectada.

ii) Como consecuencia del punto anterior, la incorporación de aminoácidos diversos, mediada por el reconocimiento del codón UAG por distintos ARNt supresores naturales, podrían influir en la **actividad de la enzima β -galactosidasa sintetizada** (Johnson y col., 2012), resultando ésta menos eficiente en la degradación del sustrato (ONPG). Así, por ejemplo, se ha descrito que para estirpes de *E. coli* B (BL21 $\Delta prfA$) puede producirse la incorporación de Tyr, Gln o Trp en el lugar del codón ámbar de manera natural (Johnson y col., 2012).

iii) Eventos de recombinación homóloga entre las copias *prfA^{ts}* y WH1(R0-4)-*prfA* podrían dar lugar a RF1 WT en el cromosoma y, por tanto, a una mezcla de poblaciones en las células que expresan las quimeras. La tasa de revertientes del fenotipo *prfA^{ts}* por recombinación homóloga a 37°C para MRA8 cuando se crece en presencia de un plásmido que contiene RF1 WT durante 16h es de $1,2 \times 10^{-3}$ (Zhang y col., 1994), por lo que, aunque en menor medida (dado el menor tiempo de crecimiento a 30°C, aprox. 2,5 h hasta que las células alcanzan una $D_{600nm}=0,3$), no pueden descartarse eventos de este tipo que aumenten la eficiencia de terminación en las células que expresan las quimeras y, por tanto, reduzcan los niveles de actividad β -galactosidasa detectados.

iv) Contexto genético del codón de terminación: la identidad de la base situada en 3' inmediatamente a continuación del codón de parada determina la eficiencia de la terminación de la traducción en *E. coli*, siendo U>G>A/C para los codones UAA y UGA, y G>U/A>C para los codones UAG (Mora y col., 2007; Poole y col., 1995). En el caso del codón ámbar (UAG) presente en el reportero *lacZ*, la base inmediatamente a continuación del codón de terminación es una G, por lo que la afinidad de unión del RF1 soluble presente en la célula es la más alta de las posibles (Figura 42). A pesar del marcado efecto ejercido sobre RF1 por la fusión de las repeticiones del péptido amiloidogénico de RepA-WH1, y dado que las células que las portan son viables a 42°C, es evidente que, aún en presencia del péptido amiloide, una fracción de RF1 debe permanecer soluble. La eficiencia en la terminación de la traducción por parte de esas moléculas sería pues, la mayor posible, contribuyendo así a un menor nivel de β -galactosidasa sintetizada. Por otro lado, el contexto en 5' también modifica la capacidad de terminación en un codón de parada dado. En *E. coli* este efecto está mediado por la interacción entre el penúltimo (Mottagui-Tabar y col., 1994) y el último aminoácido (Bjornsson y col., 1996) sintetizados

en la cadena polipeptídica. Las mayores eficacias en terminación se asocian con la presencia de aminoácidos básicos en la penúltima posición (Bertram y col., 2001), mientras que cadenas polipeptídicas con Asp, Gly y especialmente Pro aumentan significativamente la capacidad de lectura corrida (Mottagui-Tabar y col., 1994). En nuestro caso, el último aminoácido anterior al codón ámbar es una Pro, dado que no se alteró la secuencia de aminoácidos codificada en el gen *lacZ*, compensando en parte el efecto de la guanina en 3'. No obstante, cabe destacar que el contexto genético del gen reportero es idéntico en todos los casos; siendo posible atribuir las diferencias en los niveles de actividad enzimática detectados a la disfuncionalidad de RF1, que sería dependiente de la presencia de las repeticiones del péptido amiloidogénico de RepA-WH1. Por último, la lectura corrida de un codón de terminación dado puede estimularse mediante estructuras secundarias en *cis* presentes en el ARNm a continuación del mismo (Bertram y col., 2001), aunque su presencia no ha sido valorada en este trabajo.

v) Respuesta celular a la supresión ámbar: Durante la supresión ámbar las células utilizan mecanismos de transposición y expulsión de plásmidos que portan los mecanismos ortólogos para la supresión de la terminación traducional (ARNt supresor y aminoacil-tRNA sintetasa), vía sobreexpresión de la proteína Ydil (Wang y col., 2014). Ambos mecanismos podrían afectar a la cantidad de β -galactosidasa sintetizada. Para valorar la contribución de los mismos sobre los plásmidos de nuestro sistema reportero, se extrajo ADN plasmídico de las células MRA8 tras 24h de expresión de las quimeras. Sin embargo, no se observó variación ni en la movilidad electroforética ni en la cantidad de ADN plasmídico extraído (datos no mostrados), lo que descarta la posibilidad de un mecanismo basado en Ydil.

vi) Mutaciones compensatorias: Existen mutaciones supresoras del fenotipo *prfA^{ts}* que afectan a proteínas ribosomales L7/L12 (Zhang y col., 1994) y S4 (Dahlgren y Rydén-Aulin, 2000) y a procesos de maduración del ARN 16s (Kaczanowska y Rydén-Aulin, 2004). La aparición de estas mutaciones en las células que expresasen las quimeras WH1(R_n)-RF1, conllevaría la presencia de una subpoblación con RF1 funcional a 42°C, con el consiguiente aumento en la terminación de la traducción del codón ámbar prematuro y, por tanto, menores niveles de β -galactosidasa detectables.

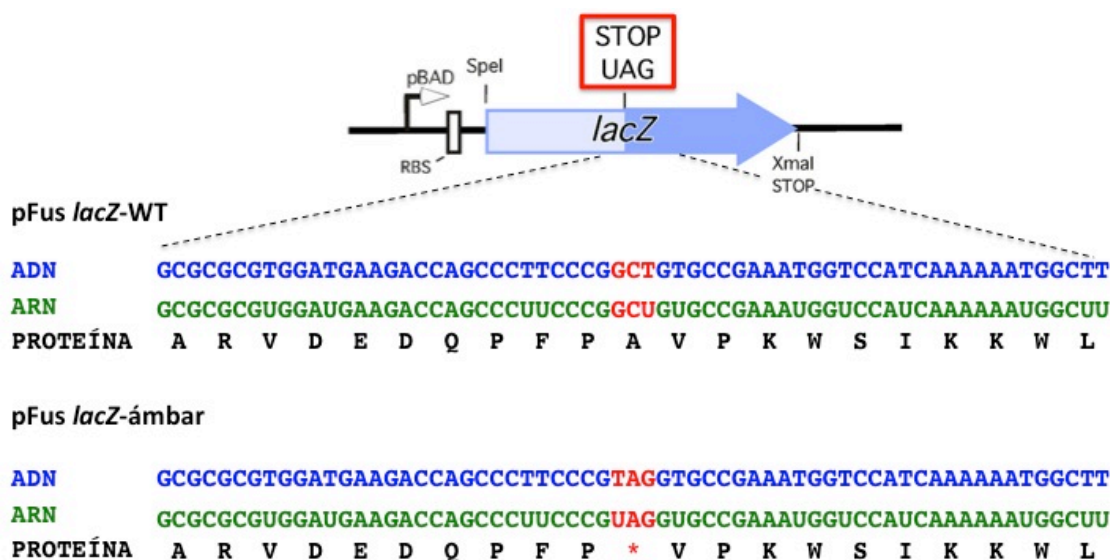


Figura 42: Contexto genético de los genes reporteros *lacZ*-WT/ámbar. En azul, verde y negro se muestran las secuencias de ADN codificante, ARNm y aminoácidos, respectivamente.

vii) Además del fenotipo *prfA^{ts}*, la cepa **MRA8 presenta una capacidad de lectura corrida incrementada con respecto a MG1655 *prfA* (WT)** (Rydén e Isaksson, 1984), lo que podría explicar la detección a 30°C de actividad β-galactosidasa a 3h de inducción de las quimeras WH1(R0-4)-RF1 en combinación con los reporteros *lacZ*-ámbar (Figura 36A). Sin embargo, esta capacidad no parece influir en los resultados obtenidos a 42°C en los que, claramente, la deficiencia en la terminación de la traducción es dependiente de la presencia de repeticiones del péptido amiloidogénico de RepA-WH1, y no de una respuesta propia de la estirpe MRA8 (Figura 36A y C)(Figura 35C).

viii) **Efecto no compensatorio de la deficiencia de RF1 por RF2 en los codones de terminación UAA:** las cepas de *E. coli* de tipo K, como MRA8, presentan una mutación en RF2 (A246T) que afecta de manera drástica, reduciéndola unas cinco veces, la actividad terminadora de RF2 en los codones UAA (Dincbas-Renqvist y col., 2000; Uno y col., 1996). Esto impide la delección de *prfA*, siendo dicha delección viable en estirpes *E. coli* de tipo B, ya que éstas mantienen la alanina en la posición 246 de RF2 (Johnson y col., 2012). En el genoma de *E. coli* el 64% de las proteínas utilizan codones de terminación UAA (Brown y col., 1990; Nakamura y col., 2000), estando en todas ellas comprometida la terminación de su síntesis al reducir los niveles de RF1 por agregación de las quimeras, disminuyendo, por tanto, de manera global la eficacia de la síntesis proteica.

ix) Metilación de los factores, requerida para su funcionalidad: Tanto RF1 como RF2 deben ser metilados en el motivo GGQ, que interacciona con el centro peptidil-transferasa (Frolova y col., 1999; Petry y col., 2005), por la metilasa PrmC (codificada en el gen *hemK*) (Heurgue-Hamard y col., 2002). La ausencia de esta modificación post-traducciona supone un descenso de 4 a 5 veces en la eficiencia de terminación de la traducción (Mora y col., 2007), por lo que, tanto la temperatura (42°C) como la agregación de las quimeras podrían reducir la cantidad de WH1(R_n)-RF1 metilado, influyendo en el proceso de terminación de la traducción en la célula a nivel global.

El estricto control de calidad ejercido en *E. coli*, tanto sobre la estabilidad de los mensajeros no completamente traducidos como sobre las proteínas parcialmente sintetizadas tras una pausa o parada de los ribosomas (Keiler y Feaga, 2014), así como los distintos factores que contribuyen a la eficacia del proceso de terminación de la traducción, podría ser una posible causa de que ésta no hubiera sido explotada hasta el momento con fines biotecnológicos en bacterias.

Sin embargo, y aún considerando todos los factores descritos anteriormente, los niveles de β-galactosidasa obtenidos concuerdan con los descritos por otros autores, que valoraron la capacidad de lectura corrida de codones de parada UAG prematuros en fusiones *lacI-lacZ*, en MRA8 (Zhang y col., 1994) y otras estirpes portando la mutación *prfA^{ts}* (Rydén e Isaksson., 1984), en ausencia de ARNt supresores. En estos ensayos, los porcentajes de lectura corrida, relativos a los controles carentes de codón de terminación prematuro (al igual que en nuestro caso), varían de 0,036 a 1,4% dependiendo de la cepa y la posición del codón de parada, siendo para MRA103 (MRA8Δ*lacZ*) a 37°C de 1,4% (Zhang y col., 1994). En nuestro caso, los valores obtenidos en MRA8Δ*lacZ* a 42°C para las quimeras WH1(R₀₋₁)-RF1 no llegan al 1%, mientras que en presencia de dos o más repeticiones del péptido amiloidogénico de RepA-WH1 los niveles varían entre 5-15%, lo que implica una clara interferencia de la presencia de dos o más repeticiones de la secuencia amiloide sobre la funcionalidad de RF1 (Figura 35C). De esta manera, los prionoides quimera WH1(R_n)-RF1, desarrollados en esta Tesis Doctoral constituyen el primer sistema sintético basado en la modulación de la terminación de la traducción de proteínas dependiente de agregación para la identificación *in vivo* de secuencias con potencial amiloide en una bacteria.

3.3. La agregación de las quimeras WH1(R2-4)-RF1 modula la terminación de la traducción en el codón prematuro UAG

La expresión de las distintas quimeras WH1(Rn)-RF1 se corroboró mediante *Western-blot* utilizando anticuerpos contra la etiqueta His6 presente en el extremo N-terminal de todas ellas (Figura 37A). Además de las bandas correspondientes al tamaño (aproximadamente 50 kDa) de los monómeros de las proteínas de fusión, se detectó una banda de proteólisis a la altura de 25 kDa y una fracción agregada, retenida cerca de los pocillos. La agregación puede ser consecuencia de contactos entre moléculas de RF1 a través del segmento amiloide y/o interacciones de RF1 con proteínas ribosomales, dado que dicha fracción también se detecta en la quimera WH1(R0)-RF1. La interacción de RF1 y RF2 con distintas proteínas ribosomales (L2, L7/L12, L11, L16, S3, S4, S5, S10 y S18) a lo largo del proceso de terminación de la traducción ha sido caracterizada mediante entrecruzamiento químico entre el ribosoma y los RFs, competición por la unión con anticuerpos específicos para distintas proteínas ribosomales, inmunomicroscopía electrónica e inhibición de la actividad de RF1 al bloquear con antibióticos el ensamblaje del ribosoma (Moffat y col., 1991). Asimismo, se ha descrito una mayor afinidad de RF1 que de RF2 por el sitio A del ribosoma, lo que podría explicar por qué RF1 co-purifica con los ribosomas, cosa que no ocurre en el caso de RF2 (Moffat y col., 1993; Pavlov y col., 1998; Jansen y Hayes., 2009). De hecho, los protocolos descritos para la identificación por *Western-blot* de RF1 a partir de células totales lisadas, incluyen el uso de agentes caotrópicos como la urea (Moffat y col., 1993; Adamski y col., 1994) para asegurar la desnaturalización completa de la proteína, dada su tendencia a la agregación. Los protocolos de purificación implican, además, un primer paso de aislamiento de la fracción ribosomal previo a la purificación cromatográfica de RF1 (Moffat y col., 1993; Adamski y col., 1994; Heurgué-Hamard y col., 2002).

Teniendo en cuenta la diferencia en los fenotipos observados de capacidad de lectura corrida, los agregados formados por RF1 en ausencia de repeticiones debían ser estructural y bioquímicamente distintos de los generados en las quimeras WH1(R2-4)-RF1. La presencia de oligómeros de naturaleza amiloide resistentes a SDS se valoró mediante SDD-AGE: además de oligómeros comunes en las distintas quimeras, debidos a la agregación de RF1 consigo mismo o a complejos de RF1 con proteínas ribosomales no susceptibles a la acción del detergente en condiciones semidesnaturalizantes, se observó

la presencia de otros dos tipos de oligómeros, de mayor y menor peso molecular que los propios de RF1, ausentes en las células que expresaban la quimera WH1(R0)-RF1 (Figura 37B). Este resultado concuerda con lo obtenido previamente en el sistema análogo de levaduras, en el que la sustitución de las repeticiones ricas en Q/N de Sup35p por repeticiones en tándem del péptido amiloidogénico de RepA-WH1 mantiene el fenotipo priónico también a nivel bioquímico, generando tanto los oligómeros resistentes a SDS, típicos de Sup35p en su estado $[PSI^+]$, como oligómeros de mayor peso molecular con gradación creciente de tamaño conforme se expanden las repeticiones WH1(Rn) (Gasset-Rosa y Giraldo, 2015).

3.4. Acción moduladora del resveratrol sobre la agregación amiloide de WH1(R2-4)-RF1 en *E. coli*

El sistema desarrollado basado en prionoides quimera WH1(Rn)-RF1 permite la monitorización *in vivo* de la amiloidogénesis. Del mismo modo debería permitir la valoración del efecto de moléculas inhibitoras sobre el proceso de agregación. Como prueba de concepto, se valoró el efecto de distintos compuestos polifenólicos descritos, *in vitro*, como inhibidores del proceso de amiloidogénesis: quercetina (Villar-Piqué y col., 2012), curcumina (Yang y col., 2005), epigallocatequina-3-galato (Ehrnhoefer y col., 2008, Hyung y col., 2012), resveratrol (Ladiwala y col., 2010) y miricetina (Ono y col., 2012). De entre todos, únicamente el resveratrol, un polifenol natural presente en epidermis y semillas de uvas y, por tanto, presente en el vino tinto (Baur y col., 2006), mostró la capacidad de revertir el fenotipo azulado (Figura 38) y reducir los niveles de β -galactosidasa detectados a 42°C al combinar las quimeras WH1(R2-4)-RF1 con el reportero *lacZ*-ámbar (Figura 40A y B). Además, el resveratrol no afectó ni al crecimiento de *E. coli* MDS42 (Figura 40C) ni a la coloración azul del control *lacZ*-WT (Figura 39B). Como el efecto observado es dependiente de la presencia de repeticiones del péptido amiloidogénico de RepA, sugerimos un papel solubilizador del resveratrol sobre las quimeras WH1(R2-4)-RF1 (Figura 39A; Figura 40A). El efecto anti-agregante del resveratrol en dichas quimeras, se valoró bioquímicamente mediante SDD-AGE a partir de lisados de células que expresaban la quimera WH1(R3)-RF1 crecidas en presencia y ausencia de resveratrol. Los resultados obtenidos confirmaron que el compuesto presenta un efecto solubilizante de los oligómeros de alto peso molecular contribuyendo a aumentar la fracción monomérica y oligomérica de bajo peso molecular. No se alteró, sin

embargo, la fracción oligomérica propia de RF1 (Figura 40D). Estos resultados concuerdan con el papel específicamente anti-amiloidogénico descrito *in vitro* para el resveratrol sobre la remodelación de oligómeros del péptido A β : La capacidad de unión del compuesto y sus derivados a los péptidos A β así como su efecto en la inhibición de la fibrilación ha sido descrito por varios grupos (Feng y col., 2009; Ono y col., 2006; Porat y col., 2006; Richard y col., 2011; Rivière y col., 2007). El resveratrol se une al péptido A β (1-42) interfiriendo en su agregación *in vitro*, al inhibir la formación de fibras y cambiar la conformación de los oligómeros, reduciendo la citotoxicidad de éstos de manera dosis-dependiente (Feng y col., 2009). En relación a la modificación de oligómeros, ha sido descrito como el resveratrol, al unirse a residuos expuestos al solvente en oligómeros del péptido A β 42 de bajo peso molecular, bloquea el proceso de oligomerización, siendo el tamaño máximo de aquéllos de 2,5 nm tras 6 h de tratamiento con el polifenol (Fu y col., 2014). Además, el tratamiento con resveratrol reduce, también de manera dosis-dependiente, la formación de placas amiloides y, por tanto, la muerte de neuronas en el hipocampo en modelos murinos (Han y col., 2004) y en líneas celulares en cultivo (Jang and Surh, 2003; Kwon y col., 2010). Asimismo, el polifenol interfiere en la cascada de toxicidad amiloide gracias a sus propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias que disminuyen la producción de especies reactivas de oxígeno y la neuroinflamación, ambas inducidas, por la deposición de agregados de A β (Bastianetto y col., 2014; Granzotto y Zatta, 2014).

A pesar de todas las funciones neuroprotectoras del resveratrol frente a la citotoxicidad inducida por el péptido A β , el mecanismo molecular subyacente no ha sido caracterizado en profundidad dada la gran variedad de dianas celulares y rutas de señalización sobre las que el compuesto actúa (sirtuinas, fosfoinositido-3-quinasa, MAP quinasa, proteína quinasa C, caspasas y factores pro-apoptóticos, enzimas pro y antioxidantes y factores pro y antiinflamatorios) (Bastianetto y col., 2014), por ello, el efecto anti-agregante del resveratrol podría verse enmascarado por sus efectos sobre otras dianas celulares en modelos animales murinos o células en cultivo. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral evidencian su acción directamente solubilizadora y/o remodeladora de oligómeros de las quimeras WH1(R2-4)-RF1, *in vivo*, en un modelo simple y minimalista, la bacteria *E. coli*. Aunque, evidentemente, no es totalmente descartable un efecto del resveratrol sobre otras dianas celulares, la reversión del fenotipo azulado, la reducción de los niveles de β -galactosidasa y la reducción de los

oligómeros de alto peso molecular de las quimeras WH1(R2-4)-RF1, demuestran una mejora en la capacidad de terminación de la traducción en el codón UAG prematuro, derivado de una mayor cantidad de WH1(Rn)-RF1 soluble, o en estado oligomérico desestructurado y funcional, tras el tratamiento con resveratrol. Estos resultados constituyen, por tanto, la prueba de concepto de que el sistema de identificación de secuencias con potencial amiloide desarrollado en esta Tesis Doctoral, es útil para llevar a cabo estudios de cribado de compuestos inhibidores de la amiloidosis a gran escala sobre distintas proteínas amiloides diana con relevancia clínica. En 2012, Villar-Piqué y colaboradores desarrollaron en *E. coli* un sistema para la búsqueda de inhibidores de la amiloidosis basado en la pérdida de fluorescencia derivada de la agregación de fusiones A β 42-GFP. Sin embargo, este sistema supone la purificación, solubilización y repliegamiento de esas fusiones de los cuerpos de inclusión de *E. coli* y constituye una alternativa *in vitro* que no tiene en cuenta la toxicidad derivada de la interacción entre otros factores celulares y las moléculas ensayadas en el proceso de inhibición de la amiloidogénesis. El sistema descrito en esta Tesis Doctoral es, por tanto, el primer sistema desarrollado *in vivo* en *E. coli* para el análisis de moléculas inhibidoras del proceso de amiloidosis a gran escala, ya que no solo monitoriza *in vivo* el potencial amiloide de una secuencia peptídica dada, sino que es, además, efectivo en la valoración de compuestos inhibidores de la amiloidosis, como el resveratrol. Asimismo, el sistema ofrece la posibilidad de descartar falsos positivos, al permitir la valoración no sólo por la apreciación subjetiva de la coloración de colonias en placa, sino también enzimática del gen reportero, así como la caracterización de la toxicidad dosis-dependiente de los distintos compuestos *in vivo* de manera rápida (dado el corto tiempo de generación de *E. coli*), sencilla y económica.

VII. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

A) The main conclusions derived from the work on RepA-WH1 cross-seeding are:

- The hyperamyloidogenic RepA-WH1(A31V) variant induces cross-aggregation in the cytoplasm of *E. coli*, enhancing the growth of amyloid particles by a different variant of the same protein with reduced amyloidogenicity.
- The colocalization assay performed in this Thesis easily discriminates *bona fide* amyloid aggregation from formation of IBs.

B) On the RepA-WH1(A31V) cytotoxicity pathways the main conclusion are:

- The expression of different variants of RepA-WH1 prionoid, A31V or Δ N37, induces a different gene expression pattern in *E. coli* cells that allowed us to identify the cellular response specifically due to amyloid aggregation. Both proteins variants also sequester different cellular factors that coaggregate with them.
- The initial event in the cyto-toxicity cascade of the RepA-WH1 prionoid seems to be membrane damage.
- The cellular toxicity of RepA-WH1 prionoid is produced by a ROS-dependent mechanism, most likely involving Fenton chemistry.

C) The chimeric WH1(R_n)-RF1 prionoids developed in this Thesis yield the following conclusions:

- The screening system based on WH1(R_n)-RF1 chimeras is useful to identify protein sequences with amyloidogenic potential *in vivo*.
- The amyloid aggregation of the WH1(R_n)-RF1 chimeras depends on having two or more repeats of the RepA-WH1(A31V) amyloidogenic peptide.
- Resveratrol treatment reverse the colored and aggregated phenotype of the WH1(R_n)-RF1 prionoids, provided they carry 2 or more repeats of the WH1(A31V) amyloidogenic peptide. Thus, the WH1(R_n)-RF1 chimeras are useful to monitor the activity of potential inhibitors of the amyloidogenic process.
- The chimeric WH1(R_n)-RF1 screening system is the first to monitor the amyloidogenic potential of peptide sequences based on the biotechnological manipulation of the bacterial translation process.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abo, T., Ueda, K., Sunohara, T., Ogawa, K., y Aiba, H. (2002). SsrA-mediated protein tagging in the presence of miscoding drugs and its physiological role in *Escherichia coli*. *Genes Cells* 7, 629-638.
- Adamski, F.M., McCaughan, K.K., Jorgensen, F., Kurland, C.G., y Tate, W.P. (1994). The concentration of polypeptide chain release factors 1 and 2 at different growth rates of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 238, 302-308.
- Adler, V., Zeiler, B., Kryukov, V., Kascsak, R., Rubenstein, R., y Grossman, A. (2003). Small, highly structured RNAs participate in the conversion of human recombinant PrP(Sen) to PrP(Res) in vitro. *J Mol Biol* 332, 47-57.
- Aguzzi, A. (2009). Cell biology: Beyond the prion principle. *Nature* 459, 924-925.
- Aguzzi, A., y Rajendran, L. (2009). The transcellular spread of cytosolic amyloids, prions, and prionoids. *Neuron* 64, 783-790.
- Alonso-Monge, R., Carvaihlo, S., Nombela, C., Rial, E., y Pla, J. (2009). The Hog1 MAP kinase controls respiratory metabolism in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Microbiology* 155, 413-423.
- Andersen, E.S., Dong, M., Nielsen, M.M., Jahn, K., Subramani, R., Mamdouh, W., Golas, M.M., Sander, B., Stark, H., Oliveira, C.L., *et al.* (2009). Self-assembly of a nanoscale DNA box with a controllable lid. *Nature* 459, 73-76.
- Andrews S.C., Robinson, A.K., y Rodríguez-Quñones, F. (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* 27, 215-237.
- Anguiano, M., Nowak, R.J., y Lansbury, P.T., Jr. (2002). Protofibrillar islet amyloid polypeptide permeabilizes synthetic vesicles by a pore-like mechanism that may be relevant to type II diabetes. *Biochemistry* 41, 11338-11343.
- Anjem, A., y Imlay, J.A. (2012) Mononuclear iron enzymes are primary targets of hydrogen peroxide stress. *J Biol Chem* 287, 15544-15556.
- Antzutkin, O.N., Leapman, R.D., Balbach, J.J., y Tycko, R. (2002). Supramolecular structural constraints on Alzheimer's beta-amyloid fibrils from electron microscopy and solid-state nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* 41, 15436-15450.
- Aravind, L., Walker, D.R., y Koonin, E.V. (1999) Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repair systems. *Nucleic Acids Res* 27, 1223-1242.
- Arenas, F.A., Covarrubias, P.C., Sandoval, J.M., Pérez-Donoso, J.M., Imlay, J.A., y Vásquez, C.C. (2011) The *Escherichia coli* BtuE protein functions as a resistance determinant against reactive oxygen species. *PLoS One* 6: e15979.
- Arispe, N., Pollard, H.B., y Rojas, E. (1994). beta-Amyloid Ca(2+)-channel hypothesis for neuronal death in Alzheimer disease. *Mol Cell Biochem* 140, 119-125.
- Arispe, N., Rojas, E., y Pollard, H.B. (1993). Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 567-571.
- Arnqvist, A., Olsen, A., y Normark, S. (1994). Sigma S-dependent growth-phase induction of the csgBA promoter in *Escherichia coli* can be achieved in vivo by sigma 70 in the absence of the nucleoid-associated protein H-NS. *Mol Microbiol* 13, 1021-1032.

Arranz, R., Mercado, G., Martín-Benito, J., Giraldo, R., Monasterio, O., Lagos, R., y Valpuesta, J.M. (2012). Structural characterization of microcin E492 amyloid formation: Identification of the precursors. *J Struct Biol* 178, 54-60.

Aslund, F., Zheng, M., Beckwith, J., y Storz, G. (1999). Regulation of the OxyR transcriptional factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 6161-6165

Bagriantsev, S.N., Kushnirov, V.V., y Liebman, S.W. (2006). Analysis of amyloid aggregates using agarose gel electrophoresis. *Methods Enzymol* 412, 33-48.

Baldwin, A.J., Knowles, T.P., Tartaglia, G.G., Fitzpatrick, A.W., Devlin, G.L., Shamma, S.L., Waudby, C.A., Mossuto, M.F., Meehan, S., Gras, S.L., *et al.* (2011). Metastability of native proteins and the phenomenon of amyloid formation. *J Am Chem Soc* 133, 14160-14163.

Barderas, R., Mendes, M., Torres, S., Bartolome, R.A., López-Lucendo, M., Villar-Vázquez, R., Pelaez-García, A., Fuente, E., Bonilla, F., y Casal, J.I. (2013). In-depth characterization of the secretome of colorectal cancer metastatic cells identifies key proteins in cell adhesion, migration, and invasion. *Mol Cell Proteomics* 12, 1602-1620.

Bastianetto, S., Menard, C., y Quirion, R. (2014). Neuroprotective action of resveratrol. *Biochim Biophys Acta*.

Baur, J.A., Pearson, K.J., Price, N.L., Jamieson, H.A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V.V., Allard, J.S., López-Lluch, G., Lewis, K., *et al.* (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444, 337-342.

Belousov, V.V., Fradkov, A.F., Lukyanov, K.A., Staroverov, D.B., Shakhbazov, K.S., Terskikh, A.V., y Lukyanov, S. (2006). Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat Methods* 3, 281-286.

Bendheim, P.E., Brown, H.R., Rudelli, R.D., Scala, L.J., Goller, N.L., Wen, G.Y., Kascsak, R.J., Cashman, N.R., y Bolton, D.C. (1992). Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. *Neurology* 42, 149-156.

Bertram, G., Innes, S., Minella, O., Richardson, J., y Stansfield, I. (2001). Endless possibilities: translation termination and stop codon recognition. *Microbiology* 147, 255-269.

Bilan, D.S., Pase, L., Joosen, L., Gorokhovatsky, A.Y., Ermakova, Y.G., Gadella, T.W., Grabher, C., Schultz, C., Lukyanov, S., y Belousov, V.V. (2013). HyPer-3: a genetically encoded H(2)O(2) probe with improved performance for ratiometric and fluorescence lifetime imaging. *ACS Chem Biol* 8, 535-542.

Bilen, J., y Bonini, N.M. (2005). Drosophila as a model for human neurodegenerative disease. *Annu Rev Genet* 39, 153-171.

Bjornsson, A., Mottagui-Tabar, S., e Isaksson, L.A. (1996). Structure of the C-terminal end of the nascent peptide influences translation termination. *EMBO J* 15, 1696-1704.

Blancas-Mejía, L.M., y Ramirez-Alvarado, M. (2013). Systemic amyloidoses. *Annu Rev Biochem* 82, 745-774.

Bobba, A., Amadoro, G., Valenti, D., Corsetti, V., Lassandro, R., y Atlante, A. (2013). Mitochondrial respiratory chain Complexes I and IV are impaired by β -amyloid via direct interaction and through Complex I-dependent ROS production, respectively. *Mitochondrion* 13, 298-311.

Brand, A.H., y Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.

- Branda, S.S., Chu, F., Kearns, D.B., Losick, R., y Kolter, R. (2006). A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Mol Microbiol* 59, 1229-1238.
- Branda, S.S., González-Pastor, J.E., Ben-Yehuda, S., Losick, R., y Kolter, R. (2001). Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11621-11626.
- Brion, J.P., Flament-Durand, J., y Dustin, P. (1986). Alzheimer's disease and tau proteins. *Lancet* 2, 1098.
- Brown, C.M., Stockwell, P.A., Trotman, C.N., y Tate, W.P. (1990). The signal for the termination of protein synthesis in procaryotes. *Nucleic Acids Res* 18, 2079-2086.
- Bullock, V.O., Fernández, J.M., y Short, J.M. (1987). X11-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5, 376-379.
- Butler, E.K., Voigt, A., Lutz, A.K., Toegel, J.P., Gerhardt, E., Karsten, P., Falkenburger, B., Reinartz, A., Winklhofer, K.F., y Schulz, J.B. (2012). The mitochondrial chaperone protein TRAP1 mitigates alpha-Synuclein toxicity. *PLoS Genet* 8, e1002488.
- Calamini, B., Silva, M.C., Madoux, F., Hutt, D.M., Khanna, S., Chalfant, M.A., Saldanha, S.A., Hodder, P., Tait, B.D., Garza, D., *et al.* (2012). Small-molecule proteostasis regulators for protein conformational diseases. *Nat Chem Biol* 8, 185-196.
- Caldinelli, L., Albani, D., y Pollegioni, L. (2013). One single method to produce native and Tat-fused recombinant human alpha-synuclein in *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol* 13, 32.
- Camilleri, A., Zarb, C., Caruana, M., Ostermeier, U., Ghio, S., Högen, T., Schmidt, F., Giese, A., y Vassallo, N. (2013) Mitochondrial membrane permeabilisation by amyloid aggregates and protection by polyphenols. *Biochim Biophys Acta* 1828, 2532-2543.
- Carrió, M., González-Montalban, N., Vera, A., Villaverde, A., y Ventura, S. (2005). Amyloid-like properties of bacterial inclusion bodies. *J Mol Biol* 347, 1025-1037.
- Caughey, B. (1991). In vitro expression and biosynthesis of prion protein. *Curr Top Microbiol Immunol* 172, 93-107.
- Caughey, B. (2003). Prion protein conversions: insight into mechanisms, TSE transmission barriers and strains. *Br Med Bull* 66, 109-120.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., y Prasher, D.C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-805.
- Chan, J.C., Oyler, N.A., Yau, W.M., y Tycko, R. (2005). Parallel beta-sheets and polar zippers in amyloid fibrils formed by residues 10-39 of the yeast prion protein Ure2p. *Biochemistry* 44, 10669-10680.
- Chandler, R.L. (1961). Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet* 1, 1378-1379.
- Chattoraj, D.K. (2000). Control of plasmid DNA replication by iterons: no longer paradoxical. *Mol Microbiol* 37, 467-476.
- Chernoff, Y.O., Lindquist, S.L., Ono, B., Inge-Vechtomov, S.G., y Liebman, S.W. (1995). Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [psi+]. *Science* 268, 880-884.
- Chesebro, B. (2003). Introduction to the transmissible spongiform encephalopathies or prion diseases. *Br Med Bull* 66, 1-20.

- Chiti, F., y Dobson, C.M. (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem* 75, 333-366.
- Choy, J.S., Aung, L.L., y Karzai, A.W. (2007). Lon protease degrades transfer-messenger RNA-tagged proteins. *J Bacteriol* 189, 6564-6571.
- Chung, K., Crane, M.M., y Lu, H. (2008). Automated on-chip rapid microscopy, phenotyping and sorting of *C. elegans*. *Nat Methods* 5, 637-643.
- Cobb, N.J., y Surewicz, W.K. (2009). Prion diseases and their biochemical mechanisms. *Biochemistry* 48, 2574-2585.
- Cordeiro, Y., Machado, F., Juliano, L., Juliano, M.A., Brentani, R.R., Foguel, D., y Silva, J.L. (2001). DNA converts cellular prion protein into the beta-sheet conformation and inhibits prion peptide aggregation. *J Biol Chem* 276, 49400-49409.
- Costa, V., y Scorrano, L. (2012). Shaping the role of mitochondria in the pathogenesis of Huntington's disease. *EMBO J* 31, 1853-1864.
- Coustou, V., Deleu, C., Saupe, S., y Begueret, J. (1997). The protein product of the het-s heterokaryon incompatibility gene of the fungus *Podospira anserina* behaves as a prion analog. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9773-9778.
- Coustou, V., Deleu, C., Saupe, S.J., y Begueret, J. (1999). Mutational analysis of the [Het-s] prion analog of *Podospira anserina*. A short N-terminal peptide allows prion propagation. *Genetics* 153, 1629-1640.
- Craigien, W.J., y Caskey, C.T. (1987). The function, structure and regulation of *E. coli* peptide chain release factors. *Biochimie* 69, 1031-1041.
- Dahlgren, A., y Rydén-Aulin, M. (2000). A novel mutation in ribosomal protein S4 that affects the function of a mutated RF1. *Biochimie* 82, 683-691.
- Datsenko, K.A., y Wanner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6640-6645.
- de Groot, N.S., Sabate, R., y Ventura, S. (2009). Amyloids in bacterial inclusion bodies. *Trends Biochem Sci* 34, 408-416.
- Deleault, N.R., Harris, B.T., Rees, J.R., y Supattapone, S. (2007). Formation of native prions from minimal components in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 9741-9746.
- Derdowski, A., Sindi, S.S., Klaiaps, C.L., DiSalvo, S., y Serio, T.R. (2010). A size threshold limits prion transmission and establishes phenotypic diversity. *Science* 330, 680-683.
- Derkatch, I.L., Chernoff, Y.O., Kushnirov, V.V., Inge-Vechtormov, S.G., y Liebman, S.W. (1996). Genesis and variability of [PSI] prion factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 144, 1375-1386.
- Destoumieux-Garzon, D., Thomas, X., Santamaria, M., Goulard, C., Barthelemy, M., Boscher, B., Bessin, Y., Molle, G., Pons, A.M., Letellier, L., *et al.* (2003). Microcin E492 antibacterial activity: evidence for a TonB-dependent inner membrane permeabilization on *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 49, 1031-1041.
- Devi, L., Raghavendran, V., Prabhu, B.M., Avadhani, N.G., y Anandatheerthavarada, H.K. (2008). Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *J Biol Chem* 283, 9089-9100.

- Diago-Navarro, E., Mora, L., Buckingham, R.H., Díaz-Orejas, R., y Lemonnier, M. (2009). Novel *Escherichia coli* RF1 mutants with decreased translation termination activity and increased sensitivity to the cytotoxic effect of the bacterial toxins Kid and RelE. *Mol Microbiol* *71*, 66-78.
- Díaz-López, T., Dávila-Fajardo, C., Blaesing, F., Lillo, M.P., y Giraldo, R. (2006). Early events in the binding of the pPS10 replication protein RepA to single iteron and operator DNA sequences. *J Mol Biol* *364*, 909-920.
- Díaz-López, T., Lages-Gonzalo, M., Serrano-López, A., Alfonso, C., Rivas, G., Díaz-Orejas, R., y Giraldo, R. (2003). Structural changes in RepA, a plasmid replication initiator, upon binding to origin DNA. *J Biol Chem* *278*, 18606-18616.
- Dincbas-Renqvist, V., Engstrom, A., Mora, L., Heurgue-Hamard, V., Buckingham, R., y Ehrenberg, M. (2000). A post-translational modification in the GGQ motif of RF2 from *Escherichia coli* stimulates termination of translation. *EMBO J* *19*, 6900-6907.
- Eaglestone, S.S., Cox, B.S., y Tuite, M.F. (1999). Translation termination efficiency can be regulated in *Saccharomyces cerevisiae* by environmental stress through a prion-mediated mechanism. *EMBO J* *18*, 1974-1981.
- Ehrnhoefer, D.E., Bieschke, J., Boeddrich, A., Herbst, M., Masino, L., Lurz, R., Engemann, S., Pastore, A., y Wanker, E.E. (2008). EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. *Nat Struct Mol Biol* *15*, 558-566.
- Eichner, T., y Radford, S.E. (2011a). A diversity of assembly mechanisms of a generic amyloid fold. *Mol Cell* *43*, 8-18.
- Eichner, T., y Radford, S.E. (2011b). Understanding the complex mechanisms of beta2-microglobulin amyloid assembly. *FEBS J* *278*, 3868-3883.
- Eisenberg, D., y Jucker, M. (2012). The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell* *148*, 1188-1203.
- Elam, J.S., Taylor, A.B., Strange, R., Antonyuk, S., Doucette, P.A., Rodríguez, J.A., Hasnain, S.S., Hayward, L.J., Valentine, J.S., Yeates, T.O., *et al.* (2003). Amyloid-like filaments and water-filled nanotubes formed by SOD1 mutant proteins linked to familial ALS. *Nat Struct Biol* *10*, 461-467.
- Eng, J.K., McCormack, A.L., y Yates, J.R. (1994). An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J Am Soc Mass Spectrom* *5*, 976-989.
- Epstein, E.A., y Chapman, M.R. (2008). Polymerizing the fibre between bacteria and host cells: the biogenesis of functional amyloid fibres. *Cell Microbiol* *10*, 1413-1420.
- Ezraty, B., Vergnes, A., Banzhaf, M., Duverger, Y., Huguenot, A., Brochado, A.R., Su, S.Y., Espinosa, L., Loiseau, L., Py, B., *et al.* (2013). Fe-S cluster biosynthesis controls uptake of aminoglycosides in a ROS-less death pathway. *Science* *340*, 1583-1587.
- Fatouros, C., Pir, G.J., Biernat, J., Koushika, S.P., Mandelkow, E., Mandelkow, E.M., Schmidt, E., y Baumeister, R. (2012). Inhibition of tau aggregation in a novel *Caenorhabditis elegans* model of tauopathy mitigates proteotoxicity. *Hum Mol Genet* *21*, 3587-3603.
- Feany, M.B., y Bender, W.W. (2000). A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature* *404*, 394-398.
- Federowicz, S., Kim, D., Ebrahim, A., Lerman, J., Nagarajan, H., Cho, B.K., Zengler, K., Palsson, B. (2014). Determining the control circuitry of redox metabolism at the genome-scale. *PLoS Genet* *10*: e1004264.

Feng, Y., Wang, X.P., Yang, S.G., Wang, Y.J., Zhang, X., Du, X.T., Sun, X.X., Zhao, M., Huang, L., y Liu, R.T. (2009). Resveratrol inhibits beta-amyloid oligomeric cytotoxicity but does not prevent oligomer formation. *Neurotoxicology* 30, 986-995.

Fernández-Funez, P., Casas-Tinto, S., Zhang, Y., Gómez-Velázquez, M., Morales-Garza, M.A., Cepeda-Nieto, A.C., Castilla, J., Soto, C., y Rincón-Limas, D.E. (2009). In vivo generation of neurotoxic prion protein: role for hsp70 in accumulation of misfolded isoforms. *PLoS Genet* 5, e1000507.

Fernández-Tresguerres, M.E., de la Espina, S.M., Gasset-Rosa, F., y Giraldo, R. (2010). A DNA-promoted amyloid proteinopathy in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 77, 1456-1469.

Fernández-Tresguerres, M.E., Martín, M., García de Viedma, D., Giraldo, R., y Díaz-Orejas, R. (1995). Host growth temperature and a conservative amino acid substitution in the replication protein of pPS10 influence plasmid host range. *J Bacteriol* 177, 4377-4384.

Fernández-Tresguerres, M.E., Martín, M., García de Viedma, D., Giraldo, R., y Díaz-Orejas, R. (1995). Host growth temperature and a conservative amino acid substitution in the replication protein of pPS10 influence plasmid host range. *J Bacteriol* 177, 4377-4384.

Fitzpatrick, A.W., Debelouchina, G.T., Bayro, M.J., Clare, D.K., Caporini, M.A., Bajaj, V.S., Jaroniec, C.P., Wang, L., Ladizhansky, V., Muller, S.A., *et al.* (2013). Atomic structure and hierarchical assembly of a cross-beta amyloid fibril. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 5468-5473.

Folsom, J.P., Parker, A.E., y Carlson, R.P. (2014). Physiological and proteomic analysis of *Escherichia coli* iron-limited chemostat growth. *J Bacteriol* 196, 2748-2761.

Foti, J.J., Devadoss, B., Winkler, J.A., Collins, J.J., y Walker, G.C. (2012). Oxidation of the guanine nucleotide pool underlies cell death by bactericidal antibiotics. *Science* 336, 315-319.

Fowler, D.M., Koulov, A.V., Alory-Jost, C., Marks, M.S., Balch, W.E., y Kelly, J.W. (2006). Functional amyloid formation within mammalian tissue. *PLoS Biol* 4, e6.

Franceschini, A., Szklarczyk, D., Frankild, S., Kuhn, M., Simonovic, M., Roth, A., Lin, J., Mínguez, P., Bork, P., von Mering, C., *et al.* (2013). STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res* 41, D808-815.

Frederick, K.K., Debelouchina, G.T., Kayatekin, C., Dorminy, T., Jacavone, A.C., Griffin, R.G., y Lindquist, S. (2014). Distinct prion strains are defined by amyloid core structure and chaperone binding site dynamics. *Chem Biol* 21, 295-305.

Freistroffer, D.V., Pavlov, M.Y., MacDougall, J., Buckingham, R.H., y Ehrenberg, M. (1997). Release factor RF3 in *E.coli* accelerates the dissociation of release factors RF1 and RF2 from the ribosome in a GTP-dependent manner. *EMBO J* 16, 4126-4133.

Frieden, C. (2007). Protein aggregation processes: In search of the mechanism. *Protein Sci* 16, 2334-2344.

Frolova, L.Y., Tsivkovskii, R.Y., Sivolobova, G.F., Oparina, N.Y., Serpinsky, O.I., Blinov, V.M., Tatkov, S.I., y Kisselev, L.L. (1999). Mutations in the highly conserved GGQ motif of class 1 polypeptide release factors abolish ability of human eRF1 to trigger peptidyl-tRNA hydrolysis. *RNA* 5, 1014-1020.

Fu, Z., Aucoin, D., Ahmed, M., Ziliox, M., Van Nostrand, W.E., y Smith, S.O. (2014). Capping of abeta42 oligomers by small molecule inhibitors. *Biochemistry* 53, 7893-7903.

Gao, G., y Chang, Y.Z. (2014). Mitochondrial ferritin in the regulation of brain iron homeostasis and neurodegenerative diseases. *Front Pharmacol* 5, 19.

- García de Viedma, D., Serrano-López, A., y Díaz-Orejás, R. (1995). Specific binding of the replication protein of plasmid pPS10 to direct and inverted repeats is mediated by an HTH motif. *Nucleic Acids Res* 23, 5048-5054.
- García-Escudero, V., Martín-Maestro, P., Perry, G., y Ávila, J. (2013). Deconstructing mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease. *Oxid Med Cell Longev* 2013: 162152.
- Garrity, S.J., Sivanathan, V., Dong, J., Lindquist, S., y Hochschild, A. (2010). Conversion of a yeast prion protein to an infectious form in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 10596-10601.
- Garza-Sánchez, F., Schaub, R.E., Janssen, B.D., y Hayes, C.S. (2011). tmRNA regulates synthesis of the ArfA ribosome rescue factor. *Mol Microbiol* 80, 1204-1219.
- Gasset-Rosa, F. (2012). *Proteinopatías amiloides: Desarrollo de un nuevo sistema modelo en microorganismos basado en RepA-WH1*. Tesis Doctoral.
- Gasset-Rosa, F., y Giraldo, R. (2015). Engineered bacterial hydrophobic oligopeptide repeats in a synthetic yeast prion [REP-PSI⁺]. *Front. Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2015.00311.
- Gasset-Rosa, F., Coquel, A.S., Moreno-Del Álamo, M., Chen, P., Song, X., Serrano, A.M., Fernández-Tresguerres, M.E., Moreno-Díaz de la Espina, S., Lindner, A.B., y Giraldo, R. (2014). Direct assessment in bacteria of prionoid propagation and phenotype selection by Hsp70 chaperone. *Mol Microbiol* 91, 1070-1087.
- Gasset-Rosa, F., Díaz-López, T., Lurz, R., Prieto, A., Fernández-Tresguerres, M.E., y Giraldo, R. (2008a). Negative regulation of pPS10 plasmid replication: origin pairing by zipping-up DNA-bound RepA monomers. *Mol Microbiol* 68, 560-572.
- Gasset-Rosa, F., Mate, M.J., Dávila-Fajardo, C., Bravo, J., y Giraldo, R. (2008b). Binding of sulphonated indigo derivatives to RepA-WH1 inhibits DNA-induced protein amyloidogenesis. *Nucleic Acids Res* 36, 2249-2256.
- Geoghegan, J.C., Valdes, P.A., Orem, N.R., Deleault, N.R., Williamson, R.A., Harris, B.T., y Supattapone, S. (2007). Selective incorporation of polyanionic molecules into hamster prions. *J Biol Chem* 282, 36341-36353.
- Gerdes, S.Y., Scholle, M.D., Campbell, J.W., Balazsi, G., Ravasz, E., Daugherty, M.D., Somera, A.L., Kyrpides, N.C., Anderson, I., Gelfand, M.S., *et al.* (2003). Experimental determination and system level analysis of essential genes in *Escherichia coli* MG1655. *J Bacteriol* 185, 5673-5684.
- Gerstel, U., y Romling, U. (2003). The *csgD* promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella typhimurium*. *Res Microbiol* 154, 659-667.
- Giraldo, R. (2003). Common domains in the initiators of DNA replication in Bacteria, Archaea and Eukarya: combined structural, functional and phylogenetic perspectives. *FEMS Microbiol Rev* 26, 533-554.
- Giraldo, R. (2007). Defined DNA sequences promote the assembly of a bacterial protein into distinct amyloid nanostructures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 17388-17393.
- Giraldo, R. (2010). Amyloid assemblies: protein legos at a crossroads in bottom-up synthetic biology. *ChemBiochem* 11, 2347-2357.
- Giraldo, R., y Fernández-Tresguerres, M.E. (2004). Twenty years of the pPS10 replicon: insights on the molecular mechanism for the activation of DNA replication in iteron-containing bacterial plasmids. *Plasmid* 52, 69-83.
- Giraldo, R., Andreu, J.M., y Díaz-Orejás, R. (1998). Protein domains and conformational changes in the activation of RepA, a DNA replication initiator. *EMBO J* 17, 4511-4526.

- Giraldo, R., Fernández-Tornero, C., Evans, P.R., Díaz-Orejas, R., y Romero, A. (2003). A conformational switch between transcriptional repression and replication initiation in the RepA dimerization domain. *Nat Struct Biol* 10, 565-571.
- Glabe, C.G. (2006). Common mechanisms of amyloid oligomer pathogenesis in degenerative disease. *Neurobiol Aging* 27, 570-575.
- Glover, J.R., Kowal, A.S., Schirmer, E.C., Patino, M.M., Liu, J.J., y Lindquist, S. (1997). Self-seeded fibers formed by Sup35, the protein determinant of [PSI⁺], a heritable prion-like factor of *S. cerevisiae*. *Cell* 89, 811-819.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Del Tredici, K., y Braak, H. (2013). 100 years of Lewy pathology. *Nat Rev Neurol* 9, 13-24.
- Goldsbury, C.S., Cooper, G.J., Goldie, K.N., Muller, S.A., Saafi, E.L., Gruijters, W.T., Misur, M.P., Engel, A., Aebi, U., y Kistler, J. (1997). Polymorphic fibrillar assembly of human amylin. *J Struct Biol* 119, 17-27.
- Gottesman, S., Roche, E., Zhou, Y., y Sauer, R.T. (1998). The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system. *Genes Dev* 12, 1338-1347.
- Graille, M., Heurgue-Hamard, V., Champ, S., Mora, L., Scrima, N., Ulryck, N., van Tilbeurgh, H., y Buckingham, R.H. (2005). Molecular basis for bacterial class I release factor methylation by PrmC. *Mol Cell* 20, 917-927.
- Granzotto, A., y Zatta, P. (2014). Resveratrol and Alzheimer's disease: message in a bottle on red wine and cognition. *Front Aging Neurosci* 6, 95.
- Gray, MW. (2012). Mitochondrial evolution. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4: a011403.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y.C., Quinlan, M., Wisniewski, H.M., y Binder, L.I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 4913-4917.
- Gunasekera, T.S., Csonka, L.N., Paliy, O. (2008). Genome-wide transcriptional responses of *Escherichia coli* K-12 to continuous osmotic and heat stresses. *J Bacteriol* 190: 3712-3720r.
- Haelterman, N.A., Yoon, W.H., Sandoval, H., Jaiswal, M., Shulman, J.M., y Bellen, H.J. (2014). A mitocentric view of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci* 37, 137-159.
- Halfmann, R., y Lindquist, S. (2010). Epigenetics in the extreme: prions and the inheritance of environmentally acquired traits. *Science* 330, 629-632.
- Hammar, M., Arnqvist, A., Bian, Z., Olsen, A., y Normark, S. (1995). Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin- and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* 18, 661-670.
- Han, Y.S., Zheng, W.H., Bastianetto, S., Chabot, J.G., y Quirion, R. (2004). Neuroprotective effects of resveratrol against beta-amyloid-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons: involvement of protein kinase C. *Br J Pharmacol* 141, 997-1005.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Harper, J.D., y Lansbury, P.T., Jr. (1997). Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu Rev Biochem* 66, 385-407.
- Harris, D.A. (1999). Cellular biology of prion diseases. *Clin Microbiol Rev* 12, 429-444.

- Hashimoto, M., Rockenstein, E., Crews, L., y Masliah, E. (2003). Role of protein aggregation in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Neuromolecular Med* 4, 21-36.
- Hay, D.G., Sathasivam, K., Tobaben, S., Stahl, B., Marber, M., Mestril, R., Mahal, A., Smith, D.L., Woodman, B., y Bates, G.P. (2004). Progressive decrease in chaperone protein levels in a mouse model of Huntington's disease and induction of stress proteins as a therapeutic approach. *Hum Mol Genet* 13, 1389-1405.
- Hayes, C.S., y Keiler, K.C. (2010). Beyond ribosome rescue: tmRNA and co-translational processes. *FEBS Lett* 584, 413-419.
- Hayes, C.S., Bose, B., y Sauer, R.T. (2002a). Proline residues at the C terminus of nascent chains induce SsrA tagging during translation termination. *J Biol Chem* 277, 33825-33832.
- Hayes, C.S., Bose, B., y Sauer, R.T. (2002b). Stop codons preceded by rare arginine codons are efficient determinants of SsrA tagging in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3440-3445.
- Hedskog, L., Pinho, C.M., Filadi, R., Rönnbäck, A., Hertwig, L., Wiehager, B., Larssen, P., Gellhaar, S., Sandebring, A., Westerlund, M., *et al.* (2013). Modulation of the endoplasmic reticulum-mitochondria interface in Alzheimer's disease and related models. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 7916-7921.
- Heinemann, I.U., Rovner, A.J., Aerni, H.R., Rogulina, S., Cheng, L., Olds, W., Fischer, J.T., Soll, D., Isaacs, F.J., y Rinehart, J. (2012). Enhanced phosphoserine insertion during *Escherichia coli* protein synthesis via partial UAG codon reassignment and release factor 1 deletion. *FEBS Lett* 586, 3716-3722.
- Herman, C., Thevenet, D., Bouloc, P., Walker, G.C., y D'Ari, R. (1998). Degradation of carboxy-terminal-tagged cytoplasmic proteins by the *Escherichia coli* protease HflB (FtsH). *Genes Dev* 12, 1348-1355.
- Herring, C.D., Glasner, J.D., y Blattner, F.R. (2003). Gene replacement without selection: regulated suppression of amber mutations in *Escherichia coli*. *Gene* 311, 153-163.
- Herrmann, U.S., Sonati, T., Falsig, J., Reimann, R.R., Dametto, P., O'Connor, T., Li, B., Lau, A., Hornemann, S., Sorce, S., Wagner, U., Sanoudou, D., y Aguzzi, A. (2015). Prion infections and anti-PrP antibodies trigger converging neurotoxic pathways. *PLoS Pathog* 11: e1004662.
- Heurgue-Hamard, V., Champ, S., Engstrom, A., Ehrenberg, M., y Buckingham, R.H. (2002). The hemK gene in *Escherichia coli* encodes the N(5)-glutamine methyltransferase that modifies peptide release factors. *EMBO J* 21, 769-778.
- Hirakura, Y., Azimov, R., Azimova, R., y Kagan, B.L. (2000). Polyglutamine-induced ion channels: a possible mechanism for the neurotoxicity of Huntington and other CAG repeat diseases. *J Neurosci Res* 60, 490-494.
- Honn, M., Lindgren, H., y Sjostedt, A. (2012). The role of MglA for adaptation to oxidative stress of *Francisella tularensis* LVS. *BMC Microbiol* 12, 14.
- Hwang, D., Lee, I.Y., Yoo, H., Gehlenborg, N., Cho, J.H., Petritis, B., Baxter, D., Pitstick, R., Young, R., Spicer, D., Price, N.D., Hohmann, J.G., DeArmond, S.J., Carlson, G.A., y Hood, L.E. (2009). A systems approach to prion disease. *Mol Syst Biol* 5: 252
- Hyung, S.J., DeToma, A.S., Brender, J.R., Lee, S., Vivekanandan, S., Kochi, A., Choi, J.S., Ramamoorthy, A., Ruotolo, B.T., y Lim, M.H. (2013). Insights into antiamyloidogenic properties of the green tea extract (-)-epigallocatechin-3-gallate toward metal-associated amyloid-beta species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 3743-3748.

- Iijima, K., Liu, H.P., Chiang, A.S., Hearn, S.A., Konsolaki, M., y Zhong, Y. (2004). Dissecting the pathological effects of human Abeta40 and Abeta42 in *Drosophila*: a potential model for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 6623-6628.
- Imlay, J.A. (2008). Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem* *77*, 755-776.
- Irvine, G.B., El-Agnaf, O.M., Shankar, G.M., y Walsh, D.M. (2008). Protein aggregation in the brain: the molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Mol Med* *14*, 451-464.
- Ito, K., Uno, M., y Nakamura, Y. (2000). A tripeptide 'anticodon' deciphers stop codons in messenger RNA. *Nature* *403*, 680-684.
- Itoh, K., Nakamura, K., Iijima, M., y Sesaki, H. (2012). Mitochondrial dynamics in neurodegeneration. *Trends Cell Biol* *23*, 64-71.
- Ivanova, M.I., Sievers, S.A., Sawaya, M.R., Wall, J.S., y Eisenberg, D. (2009). Molecular basis for insulin fibril assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 18990-18995.
- Jackrel, M.E., DeSantis, M.E., Martínez, B.A., Castellano, L.M., Stewart, R.M., Caldwell, K.A., Caldwell, G.A., y Shorter, J. (2014). Potentiated Hsp104 variants antagonize diverse proteotoxic misfolding events. *Cell* *156*, 170-182.
- Jang, S., e Imlay, J.A. (2010). Hydrogen peroxide inactivates *Escherichia coli* Isc iron-sulphur assembly system, and OxyR induces the Suf system to compensate. *Mol Microbiol* *78*, 1448-1467.
- Jang, J.H., y Surh, Y.J. (2003). Protective effect of resveratrol on beta-amyloid-induced oxidative PC12 cell death. *Free Radic Biol Med* *34*, 1100-1110.
- Janssen, B.D., y Hayes, C.S. (2009). Kinetics of paused ribosome recycling in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* *394*, 251-267.
- Jellinger, K.A. (2009). A critical evaluation of current staging of alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders. *Biochim Biophys Acta* *1792*, 730-740.
- Johnson, D.B., Wang, C., Xu, J., Schultz, M.D., Schmitz, R.J., Ecker, J.R., y Wang, L. (2012). Release factor one is nonessential in *Escherichia coli*. *ACS Chem Biol* *7*, 1337-1344.
- Johnson, D.B., Xu, J., Shen, Z., Takimoto, J.K., Schultz, M.D., Schmitz, R.J., Xiang, Z., Ecker, J.R., Briggs, S.P., y Wang, L. (2011). RF1 knockout allows ribosomal incorporation of unnatural amino acids at multiple sites. *Nat Chem Biol* *7*, 779-786.
- Josefczuk, S., Klie, S., Catchpole, G., Szymanski, J., Cuadros-Inostroza, A., Steinhäuser, D., Selbig, J., y Willmitzer, L. (2010). Metabolomic and transcriptomic stress response of *Escherichia coli*. *Mol Syst Biol* *6*, 364.
- Jucker, M., y Walker, L.C. (2013). Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature* *501*, 45-51.
- Jun, S., y Wright, A. (2010). Entropy as the driver of chromosome segregation. *Nat Rev Microbiol* *8*, 600-607.
- Kaczanowska, M., y Rydén-Aulin, M. (2004). Temperature sensitivity caused by mutant release factor 1 is suppressed by mutations that affect 16S rRNA maturation. *J Bacteriol* *186*, 3046-3055.
- Kagan, B.L., Azimov, R., y Azimova, R. (2004). Amyloid peptide channels. *J Membr Biol* *202*, 1-10.

- Kajava, A.V., Baxa, U., y Steven, A.C. (2010). Beta arcades: recurring motifs in naturally occurring and disease-related amyloid fibrils. *FASEB J* 24, 1311-1319.
- Kandel, E.R. (2012). The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB. *Mol Brain* 5, 14.
- Keiler, K.C. (2008). Biology of trans-translation. *Annu Rev Microbiol* 62, 133-151.
- Keiler, K.C., y Feaga, H.A. (2014). Resolving nonstop translation complexes is a matter of life or death. *J Bacteriol* 196, 2123-2130.
- Keiler, K.C., Waller, P.R., y Sauer, R.T. (1996). Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. *Science* 271, 990-993.
- Keseler, I.M., Mackie, A., Peralta-Gil, M., Santos-Zavaleta, A., Gama-Castro, S., Bonavides-Martínez, C., Fulcher, C., Huerta, A.M., Kothari, A., Krummenacker, M., *et al.* (2013). EcoCyc: fusing model organism databases with systems biology. *Nucleic Acids Res* 41, D605-612.
- Khurana, V., y Lindquist, S. (2010). Modelling neurodegeneration in *Saccharomyces cerevisiae*: why cook with baker's yeast? *Nat Rev Neurosci* 11, 436-449.
- Kisselev, L., Ehrenberg, M., y Frolova, L. (2003). Termination of translation: interplay of mRNA, rRNAs and release factors? *EMBO J* 22, 175-182.
- Korostelev, A., Asahara, H., Lancaster, L., Laurberg, M., Hirschi, A., Zhu, J., Trakhanov, S., Scott, W.G., y Noller, H.F. (2008). Crystal structure of a translation termination complex formed with release factor RF2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19684-19689.
- Kovacs, G.G., Trabattoni, G., Hainfellner, J.A., Ironside, J.W., Knight, R.S., y Budka, H. (2002). Mutations of the prion protein gene phenotypic spectrum. *J Neurol* 249, 1567-1582.
- Krammer, C., Kryndushkin, D., Suhre, M.H., Kremmer, E., Hofmann, A., Pfeifer, A., Scheibel, T., Wickner, R.B., Schatzl, H.M., y Vorberg, I. (2009). The yeast Sup35NM domain propagates as a prion in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 462-467.
- Krishnan, R., y Lindquist, S.L. (2005). Structural insights into a yeast prion illuminate nucleation and strain diversity. *Nature* 435, 765-772.
- Kushnirov, V.V., y Ter-Avanesyan, M.D. (1998). Structure and replication of yeast prions. *Cell* 94, 13-16.
- Kwon, K.J., Kim, H.J., Shin, C.Y., y Han, S.H. (2010). Melatonin Potentiates the Neuroprotective Properties of Resveratrol Against Beta-Amyloid-Induced Neurodegeneration by Modulating AMP-Activated Protein Kinase Pathways. *J Clin Neurol* 6, 127-137.
- Ladiwala, A.R., Lin, J.C., Bale, S.S., Marcelino-Cruz, A.M., Bhattacharya, M., Dordick, J.S., y Tessier, P.M. (2010). Resveratrol selectively remodels soluble oligomers and fibrils of amyloid A β into off-pathway conformers. *J Biol Chem* 285, 24228-24237.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.
- Lai, C.H., Chou, C.Y., Ch'ang, L.Y., Liu, C.S., y Lin, W. (2000). Identification of novel human genes evolutionarily conserved in *Caenorhabditis elegans* by comparative proteomics. *Genome Res* 10, 703-713.
- Lajoie, M.J., Rovner, A.J., Goodman, D.B., Aerni, H.R., Haimovich, A.D., Kuznetsov, G., Mercer, J.A., Wang, H.H., Carr, P.A., Mosberg, J.A., *et al.* (2013). Genomically recoded organisms expand biological functions. *Science* 342, 357-360.

- Lakso, M., Vartiainen, S., Moilanen, A.M., Sirvio, J., Thomas, J.H., Nass, R., Blakely, R.D., y Wong, G. (2003). Dopaminergic neuronal loss and motor deficits in *Caenorhabditis elegans* overexpressing human alpha-synuclein. *J Neurochem* 86, 165-172.
- Lashuel, H.A., y Lansbury, P.T., Jr. (2006). Are amyloid diseases caused by protein aggregates that mimic bacterial pore-forming toxins? *Q Rev Biophys* 39, 167-201.
- Lashuel, H.A., Hartley, D., Petre, B.M., Walz, T., y Lansbury, P.T., Jr. (2002). Neurodegenerative disease: amyloid pores from pathogenic mutations. *Nature* 418, 291.
- Laskowski, R.A., Gerick, F., y Thornton, J.M. (2009). The structural basis of allosteric regulation in proteins. *FEBS Lett* 583, 1692-1698.
- Laurberg, M., Asahara, H., Korostelev, A., Zhu, J., Trakhanov, S., y Noller, H.F. (2008). Structural basis for translation termination on the 70S ribosome. *Nature* 454, 852-857.
- Lee, J., Hiibel, S.R., Reardon, K.F., y Wood, T.K. (2009). Identification of stress-related proteins in *Escherichia coli* using the pollutant cis-dichloroethylene. *J Appl Microbiol* 108, 1088-2102.
- Lee, H.J., Patel, S., y Lee, S.J. (2005). Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates. *J Neurosci* 25, 6016-6024.
- Lee, H.J., Suk, J.E., Bae, E.J., Lee, J.H., Paik, S.R., y Lee, S.J. (2008). Assembly-dependent endocytosis and clearance of extracellular alpha-synuclein. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 1835-1849.
- Li, J.Y., Englund, E., Holton, J.L., Soulet, D., Hagell, P., Lees, A.J., Lashley, T., Quinn, N.P., Rehnkrone, S., Bjorklund, A., *et al.* (2008). Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med* 14, 501-503.
- Lian, H.Y., Jiang, Y., Zhang, H., Jones, G.W., y Perrett, S. (2006). The yeast prion protein Ure2: structure, function and folding. *Biochim Biophys Acta* 1764, 535-545.
- Liebman, S.W., y Chernoff, Y.O. (2012). Prions in yeast. *Genetics* 191, 1041-1072.
- Lin, M.T., y Beal, M.F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443, 787-795.
- Lindner, A.B., Madden, R., Demarez, A., Stewart, E.J., y Taddei, F. (2008). Asymmetric segregation of protein aggregates is associated with cellular aging and rejuvenation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3076-3081.
- Liu, C., Sawaya, M.R., y Eisenberg, D. (2011). beta(2)-microglobulin forms three-dimensional domain-swapped amyloid fibrils with disulfide linkages. *Nat Struct Mol Biol* 18, 49-55.
- Liu, J.J., y Lindquist, S. (1999). Oligopeptide-repeat expansions modulate 'protein-only' inheritance in yeast. *Nature* 400, 573-576.
- Liu, J.J., Sondheimer, N., y Lindquist, S.L. (2002). Changes in the middle region of Sup35 profoundly alter the nature of epigenetic inheritance for the yeast prion [PSI⁺]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 Suppl 4, 16446-16453.
- Lobato-Márquez, D., Moreno-Córdoba, I., Figueroa, V., Díaz-Orejas, R., y García-Del Portillo, F. (2015). Distinct type I and type II toxin-antitoxin modules control *Salmonella* lifestyle inside eukaryotic cells. *Sci Rep* 5, 9374.
- Lu, J.X., Qiang, W., Yau, W.M., Schwieters, C.D., Meredith, S.C., y Tycko, R. (2013). Molecular structure of beta-amyloid fibrils in Alzheimer's disease brain tissue. *Cell* 154, 1257-1268.

- Luheshi, L.M., Tartaglia, G.G., Brorsson, A.C., Pawar, A.P., Watson, I.E., Chiti, F., Vendruscolo, M., Lomas, D.A., Dobson, C.M., y Crowther, D.C. (2007). Systematic in vivo analysis of the intrinsic determinants of amyloid Beta pathogenicity. *PLoS Biol* 5, e290.
- Ma, J., y Lindquist, S. (2002). Conversion of PrP to a self-perpetuating PrPSc-like conformation in the cytosol. *Science* 298, 1785-1788.
- Maestro, B., Sanz, J.M., Díaz-Orejas, R., y Fernández-Tresguerres, E. (2003). Modulation of pPS10 host range by plasmid-encoded RepA initiator protein. *J Bacteriol* 185, 1367-1375.
- Maisonneuve, E., Shakespeare, L.J., Jorgensen, M.G., y Gerdes, K. (2011). Bacterial persistence by RNA endonucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 13206-13211.
- Málaga-Trillo, E., Solís, G.P., Schrock, Y., Geiss, C., Luncz, L., Thomanetz, V., y Stuermer, C.A. (2009). Regulation of embryonic cell adhesion by the prion protein. *PLoS Biol* 7, e55.
- Malone, A.S., Chung, Y.K., y Yousef, A.E. (2006). Genes of *Escherichia coli* O157:H7 that are involved in high-pressure resistance. *Appl Environ Microbiol* 72, 2661-2671.
- Mark, R.J., Blanc, E.M., y Mattson, M.P. (1996). Amyloid beta-peptide and oxidative cellular injury in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 12, 211-224.
- Martin, J.E., e Imlay, J.A. (2011). The alternative aerobic ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*, NrdEF, is a manganese-dependent enzyme that enables cell replication during periods of iron starvation. *Mol Microbiol* 80, 319-334.
- Massé, E., Vanderpool, C.K., y Gottesman, S. (2005). Effect of RhyB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187, 6962-6971.
- Mattson, M.P. (1994). Calcium and neuronal injury in Alzheimer's disease. Contributions of beta-amyloid precursor protein mismetabolism, free radicals, and metabolic compromise. *Ann N Y Acad Sci* 747, 50-76.
- Mattson, M.P. (1995). Degenerative and protective signaling mechanisms in the neurofibrillary pathology of AD. *Neurobiol Aging* 16, 447-457; discussion 458-463.
- Mayer, F., Mayer, N., Chinn, L., Pinsonneault, R.L., Kroetz, D., y Bainton, R.J. (2009). Evolutionary conservation of vertebrate blood-brain barrier chemoprotective mechanisms in *Drosophila*. *J Neurosci* 29, 3538-3550.
- Mecozzi, V.J., Berman, D.E., Simoes, S., Vetanovetz, C., Awal, M.R., Patel, V.M., Schneider, R.T., Petsko, G.A., Ringe, D., y Small, S.A. (2014). Pharmacological chaperones stabilize retromer to limit APP processing. *Nat Chem Biol* 10, 443-449.
- Medina, I., Carbonell, J., Pulido, L., Madeira, S.C., Goetz, S., Conesa, A., Tarraga, J., Pascual-Montano, A., Nogales-Cadenas, R., Santoyo, J., *et al.* (2010). Babelomics: an integrative platform for the analysis of transcriptomics, proteomics and genomic data with advanced functional profiling. *Nucleic Acids Res* 38, W210-213.
- Messner KR, Imlay JA (1999) The identification of the primary sites of superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain and sulphite reductase complex of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 274: 10119-10128
- Miller, J.H. (1972). *Experiments in molecular genetics*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Milman, G., Goldstein, J., Scolnick, E., y Caskey, T. (1969). Peptide chain termination. 3. Stimulation of in vitro termination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 63, 183-190.

- Mizuno, N., Baxa, U., y Steven, A.C. (2011). Structural dependence of HET-s amyloid fibril infectivity assessed by cryoelectron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 3252-3257.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., y Klionsky, D.J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* *451*, 1069-1075.
- Moffat, J.G., Donly, B.C., McCaughan, K.K., y Tate, W.P. (1993). Functional domains in the *Escherichia coli* release factors. Activities of hybrids between RF-1 and RF-2. *Eur J Biochem* *213*, 749-756.
- Moffat, J.G., Timms, K.M., Trotman, C.N., y Tate, W.P. (1991). Interaction of the release factors with the *Escherichia coli* ribosome: structurally and functionally-important domains. *Biochimie* *73*, 1113-1120.
- Molina-García, L., y Gasset-Rosa, F. (2014). Semi-denaturing Detergent Agarose Gel Electrophoresis (SDD-AGE). *Bio-protocol* *4*(22): e1297.<http://www.bio-protocol.org/e1297>.
- Molina-García, L., y Giraldo, R. (2014). Aggregation interplay between variants of the RepA-WH1 prionoid in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* *196*, 2536-2542.
- Moore, S.D., y Sauer, R.T. (2007). The tmRNA system for translational surveillance and ribosome rescue. *Annu Rev Biochem* *76*, 101-124.
- Mora, L., Heurgue-Hamard, V., Champ, S., Ehrenberg, M., Kisselev, L.L., y Buckingham, R.H. (2003). The essential role of the invariant GGQ motif in the function and stability in vivo of bacterial release factors RF1 and RF2. *Mol Microbiol* *47*, 267-275.
- Mora, L., Heurgue-Hamard, V., de Zamaroczy, M., Kervestin, S., y Buckingham, R.H. (2007). Methylation of bacterial release factors RF1 and RF2 is required for normal translation termination in vivo. *J Biol Chem* *282*, 35638-35645.
- Morales, R., Moreno-González, I., y Soto, C. (2013). Cross-seeding of misfolded proteins: implications for etiology and pathogenesis of protein misfolding diseases. *PLoS Pathog* *9*, e1003537.
- Morell, M., Bravo, R., Espargaró, A., Sisquella, X., Avilés, F.X., Fernández-Busquets, X., y Ventura, S. (2008). Inclusion bodies: specificity in their aggregation process and amyloid-like structure. *Biochim Biophys Acta* *1783*, 1815-1825.
- Moreno-del Álamo, M. (2008). Un motivo clave en la proteína Orc4p para el ensamblaje del complejo iniciador de la replicación en *S.cerevisiae*. Tesis Doctoral.
- Moreno-del Álamo, M., Sánchez-Gorostiaga, A., Serrano, A.M., Prieto, A., Cuellar, J., Martín-Benito, J., Valpuesta, J.M., y Giraldo, R. (2010). Structural analysis of the interactions between hsp70 chaperones and the yeast DNA replication protein Orc4p. *J Mol Biol* *403*, 24-39.
- Mottagui-Tabar, S., Bjornsson, A., e Isaksson, L.A. (1994). The second to last amino acid in the nascent peptide as a codon context determinant. *EMBO J* *13*, 249-257.
- Munavar, H., Zhou, Y., y Gottesman, S. (2005). Analysis of the *Escherichia coli* Alp phenotype: heat shock induction in *ssrA* mutants. *J Bacteriol* *187*, 4739-4751.
- Munch, C., O'Brien, J., y Bertolotti, A. (2011). Prion-like propagation of mutant superoxide dismutase-1 misfolding in neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 3548-3553.
- Murphy, D.D., Rueter, S.M., Trojanowski, J.Q., y Lee, V.M. (2000). Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *J Neurosci* *20*, 3214-3220.

- Murray, M.G., y Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8, 4321-4325.
- Nakamura, Y., Gojobori, T., e Ikemura, T. (2000). Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Res* 28, 292.
- Nandi, P.K., Leclerc, E., Nicole, J.C., y Takahashi, M. (2002). DNA-induced partial unfolding of prion protein leads to its polymerisation to amyloid. *J Mol Biol* 322, 153-161.
- Narayan, P., Ehsani, S., y Lindquist, S. (2014). Combating neurodegenerative disease with chemical probes and model systems. *Nat Chem Biol* 10, 911-920.
- Natale, P., Pazos, M., y Vicente, M. (2013). The *Escherichia coli* divisome: Born to divide. *Environ Microbiol* 15, 3169-3182.
- Neha, Sodhi, R.K., Jaggi, A.S., y Singh, N. (2014). Animal models of dementia and cognitive dysfunction. *Life Sci* 109, 73-86.
- Nelson, R., Sawaya, M.R., Balbirnie, M., Madsen, A.O., Riek, C., Grothe, R., y Eisenberg, D. (2005). Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature* 435, 773-778.
- Newington, J.T., Rappon, T., Albers, S., Wong, D.Y., Rylett, R.J., y Cumming, R.C. (2012). Overexpression of pyruvate dehydrogenase kinase 1 and lactate dehydrogenase A in nerve cells confers resistance to amyloid β and other toxins by decreasing mitochondrial respiration and reactive oxygen species production. *J Biol Chem* 287, 37245-37258.
- Nieto, C., Giraldo, R., Fernández-Tresguerres, E., y Díaz, R. (1992). Genetic and functional analysis of the basic replicon of pPS10, a plasmid specific for *Pseudomonas* isolated from *Pseudomonas syringae* patovar savastanoi. *J Mol Biol* 223, 415-426.
- Nussbaum-Krammer, C.I., y Morimoto, R.I. (2014). *Caenorhabditis elegans* as a model system for studying non-cell-autonomous mechanisms in protein-misfolding diseases. *Dis Model Mech* 7, 31-39.
- Nussbaum-Krammer, C.I., Park, K.W., Li, L., Melki, R., y Morimoto, R.I. (2013). Spreading of a prion domain from cell-to-cell by vesicular transport in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* 9, e1003351.
- Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M.P., Kent, S.B., Aebersold, R., Barry, R.A., Tempst, P., Teplow, D.B., Hood, L.E., *et al.* (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40, 735-746.
- Oh, J., Kim, J.G., Jeon, E., Yoo, C.H., Moon, J.S., Rhee, S., y Hwang, I. (2007). Amyloidogenesis of type III-dependent harpins from plant pathogenic bacteria. *J Biol Chem* 282, 13601-13609.
- Oladzad, A.A., Javanian, A., Nikkhah, M., Meratan, A.A., Ghiasi, P., Nemat-Gorgani, M. (2013). Disruption of mitochondrial membrane integrity induced by amyloid aggregates arising from variants of SOD1. *Int J Biol Macromol* 61, 212-217.
- Oliveros, J.C. (2007). Venny: An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.
- Olzscha, H., Schermann, S.M., Woerner, A.C., Pinkert, S., Hecht, M.H., Tartaglia, G.G., Vendruscolo, M., Hayer-Hartl, M., Hartl, F.U., y Vabulas, R.M. (2011). Amyloid-like aggregates sequester numerous metastable proteins with essential cellular functions. *Cell* 144, 67-78.
- Ono, K., Li, L., Takamura, Y., Yoshiike, Y., Zhu, L., Han, F., Mao, X., Ikeda, T., Takasaki, J., Nishijo, H., *et al.* (2012). Phenolic compounds prevent amyloid beta-protein oligomerization and synaptic dysfunction by site-specific binding. *J Biol Chem* 287, 14631-14643.

- Ono, K., Naiki, H., y Yamada, M. (2006). The development of preventives and therapeutics for Alzheimer's disease that inhibit the formation of beta-amyloid fibrils (fA β), as well as destabilize preformed fA β . *Curr Pharm Des* 12, 4357-4375.
- Otzen, D., y Nielsen, P.H. (2008). We find them here, we find them there: functional bacterial amyloid. *Cell Mol Life Sci* 65, 910-927.
- Paravastu, A.K., Leapman, R.D., Yau, W.M., y Tycko, R. (2008). Molecular structural basis for polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 18349-18354.
- Parham, S.N., Resende, C.G., y Tuite, M.F. (2001). Oligopeptide repeats in the yeast protein Sup35p stabilize intermolecular prion interactions. *EMBO J* 20, 2111-2119.
- Park, S.M., Jung, H.Y., Kim, T.D., Park, J.H., Yang, C.H., y Kim, J. (2002). Distinct roles of the N-terminal-binding domain and the C-terminal-solubilizing domain of alpha-synuclein, a molecular chaperone. *J Biol Chem* 277, 28512-28520.
- Patino, M.M., Liu, J.J., Glover, J.R., y Lindquist, S. (1996). Support for the prion hypothesis for inheritance of a phenotypic trait in yeast. *Science* 273, 622-626.
- Paushkin, S.V., Kushnirov, V.V., Smirnov, V.N., y Ter-Avanesyan, M.D. (1997). In vitro propagation of the prion-like state of yeast Sup35 protein. *Science* 277, 381-383.
- Pavlov, M.Y., Freistroffer, D.V., Dincbas, V., MacDougall, J., Buckingham, R.H., y Ehrenberg, M. (1998). A direct estimation of the context effect on the efficiency of termination. *J Mol Biol* 284, 579-590.
- Pawar, A.P., Dubay, K.F., Zurdo, J., Chiti, F., Vendruscolo, M., y Dobson, C.M. (2005). Prediction of "aggregation-prone" and "aggregation-susceptible" regions in proteins associated with neurodegenerative diseases. *J Mol Biol* 350, 379-392.
- Pérez, R.G., Waymire, J.C., Lin, E., Liu, J.J., Guo, F., y Zigmond, M.J. (2002). A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J Neurosci* 22, 3090-3099.
- Perutz, M.F., Staden, R., Moens, L., y De Baere, I. (1993). Polar zippers. *Curr Biol* 3, 249-253.
- Petkova, A.T., Leapman, R.D., Guo, Z., Yau, W.M., Mattson, M.P., y Tycko, R. (2005). Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Science* 307, 262-265.
- Petry, S., Brodersen, D.E., Murphy, F.V.t., Dunham, C.M., Selmer, M., Tarry, M.J., Kelley, A.C., y Ramakrishnan, V. (2005). Crystal structures of the ribosome in complex with release factors RF1 and RF2 bound to a cognate stop codon. *Cell* 123, 1255-1266.
- Poggiolini, I., Saverioni, D., y Parchi, P. (2013). Prion protein misfolding, strains, and neurotoxicity: an update from studies on Mammalian prions. *Int J Cell Biol* 2013, 910314.
- Poole, E.S., Brown, C.M., y Tate, W.P. (1995). The identity of the base following the stop codon determines the efficiency of in vivo translational termination in *Escherichia coli*. *EMBO J* 14, 151-158.
- Poole, E.S., Major, L.L., Mannering, S.A., y Tate, W.P. (1998). Translational termination in *Escherichia coli*: three bases following the stop codon crosslink to release factor 2 and affect the decoding efficiency of UGA-containing signals. *Nucleic Acids Res* 26, 954-960.
- Porat, Y., Abramowitz, A., y Gazit, E. (2006). Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism. *Chem Biol Drug Des* 67, 27-37.

- Pósfai, G., Plunkett, G., 3rd, Feher, T., Frisch, D., Keil, G.M., Umenhoffer, K., Kolisnychenko, V., Stahl, B., Sharma, S.S., de Arruda, M., *et al.* (2006). Emergent properties of reduced-genome *Escherichia coli*. *Science* *312*, 1044-1046.
- Prieto, S., Bouillaud, F., y Rial, E. (1995). The mechanism for the ATP-induced uncoupling of respiration in mitochondria of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* *307 (Pt 3)*, 657-661.
- Prusiner, S.B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* *216*, 136-144.
- Prusiner, S.B. (1998). Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 13363-13383.
- Raveendra, B.L., Siemer, A.B., Puthanveetil, S.V., Hendrickson, W.A., Kandel, E.R., y McDermott, A.E. (2013). Characterization of prion-like conformational changes of the neuronal isoform of Aplysia CPEB. *Nat Struct Mol Biol* *20*, 495-501.
- Reddy, P.S., y Housman, D.E. (1997). The complex pathology of trinucleotide repeats. *Curr Opin Cell Biol* *9*, 364-372.
- Richard, T., Pawlus, A.D., Iglesias, M.L., Pedrot, E., Waffo-Teguo, P., Merillon, J.M., y Monti, J.P. (2011). Neuroprotective properties of resveratrol and derivatives. *Ann N Y Acad Sci* *1215*, 103-108.
- Riek, R., Wider, G., Billeter, M., Hornemann, S., Glockshuber, R., y Wuthrich, K. (1998). Prion protein NMR structure and familial human spongiform encephalopathies. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 11667-11672.
- Rivière, C., Richard, T., Quentin, L., Krisa, S., Merillon, J.M., y Monti, J.P. (2007). Inhibitory activity of stilbenes on Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *Bioorg Med Chem* *15*, 1160-1167.
- Roche, E.D., y Sauer, R.T. (1999). SsrA-mediated peptide tagging caused by rare codons and tRNA scarcity. *EMBO J* *18*, 4579-4589.
- Rokney, A., Shagan, M., Kessel, M., Smith, Y., Rosenshine, I., y Oppenheim, A.B. (2009). *E. coli* transports aggregated proteins to the poles by a specific and energy-dependent process. *J Mol Biol* *392*, 589-601.
- Romero, D., Aguilar, C., Losick, R., y Kolter, R. (2010). Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 2230-2234.
- Ross, E.D., Minton, A., y Wickner, R.B. (2005). Prion domains: sequences, structures and interactions. *Nat Cell Biol* *7*, 1039-1044.
- Rydén, S.M., e Isaksson, L.A. (1984). A temperature-sensitive mutant of *Escherichia coli* that shows enhanced misreading of UAG/A and increased efficiency for some tRNA nonsense suppressors. *Mol Gen Genet* *193*, 38-45.
- Saitoh, T., Horsburgh, K., y Masliah, E. (1993). Hyperactivation of signal transduction systems in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* *695*, 34-41.
- Salvail, H., y Massé, E. (2011). Regulating iron storage and metabolism with RNA: An overview of posttranscriptional controls of intracellular iron homeostasis. *WIREs RNA* *3*, 26-36.
- Sambrook, J., y Pollack, R. (1974). Basic methodology for cell culture--cell transformation. *Methods Enzymol* *32*, 583-592.

Santos-Sierra, S., Lemonnier, M., Nuñez, B., Hargreaves, D., Rafferty, J., Giraldo, R., Andreu, J.M., y Díaz-Orejas, R. (2003). Non-cytotoxic variants of the Kid protein that retain their auto-regulatory activity. *Plasmid* 50, 120-130.

Sarafian, T.A., Ryan, C.M., Souda, P., Masliah, E., Kar, U.K., Vinters, H.V., Mathern, G.W., Faull, K.F., Whitelegge, J.P., y Watson, J.B. (2013). Impairment of mitochondria in adult mouse brain overexpressing predominantly full-length, N-terminally acetylated human α -synuclein. *PLoS One* 8: e63557

Sarkar, S. (2013). Regulation of autophagy by mTOR-dependent and mTOR-independent pathways: autophagy dysfunction in neurodegenerative diseases and therapeutic application of autophagy enhancers. *Biochem Soc Trans* 41, 1103-1130.

Sawaya, M.R., Sambashivan, S., Nelson, R., Ivanova, M.I., Sievers, S.A., Apostol, M.I., Thompson, M.J., Balbirnie, M., Wiltzius, J.J., McFarlane, H.T., *et al.* (2007). Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers. *Nature* 447, 453-457.

Schubert, D., Behl, C., Lesley, R., Brack, A., Dargusch, R., Sagara, Y., y Kimura, H. (1995). Amyloid peptides are toxic via a common oxidative mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1989-1993.

Scolnick, E., Tompkins, R., Caskey, T., y Nirenberg, M. (1968). Release factors differing in specificity for terminator codons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 61, 768-774.

Seaver, L.C., y Imlay, J.A. (2004). Are respiratory enzymes the primary source of intracellular hydrogen peroxide? *J Biol Chem* 279, 48742-48750.

Shabala, L., Browman, J., Brown, J., Ross, T., McMeekin, T., y Shabala, S. (2009). Ion transport and osmotic adjustment in *Escherichia coli* in response to ionic and non-ionic osmotic stress. *Environ Microbiol* 11, 137-148.

Shewmaker, F., McGlinchey, R.P., y Wickner, R.B. (2011). Structural insights into functional and pathological amyloid. *J Biol Chem* 286, 16533-16540.

Shewmaker, F., Wickner, R.B., y Tycko, R. (2006). Amyloid of the prion domain of Sup35p has an in-register parallel beta-sheet structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19754-19759.

Shin, D.H., Brandsen, J., Jancarik, J., Yokota, H., Kim, R., y Kim, S.H. (2004). Structural analyses of peptide release factor 1 from *Thermotoga maritima* reveal domain flexibility required for its interaction with the ribosome. *J Mol Biol* 341, 227-239.

Si, K., Choi, Y.B., White-Grindley, E., Majumdar, A., y Kandel, E.R. (2010). *Aplysia* CPEB can form prion-like multimers in sensory neurons that contribute to long-term facilitation. *Cell* 140, 421-435.

Silva-Rocha, R., Martínez-García, E., Calles, B., Chavarria, M., Arce-Rodríguez, A., de Las Heras, A., Paez-Espino, A.D., Durante-Rodríguez, G., Kim, J., Nikel, P.I., *et al.* (2013). The Standard European Vector Architecture (SEVA): a coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. *Nucleic Acids Res* 41, D666-675.

Silva, A.M., y Oliveira, P.J. (2012). Mitochondrial bioenergetics: Methods and protocols. *Methods in molecular biology*. doi: 10.1007/978-1-61779-382-02. Ed. Springer.

Silva, J.L., Lima, L.M., Foguel, D., y Cordeiro, Y. (2008). Intriguing nucleic-acid-binding features of mammalian prion protein. *Trends Biochem Sci* 33, 132-140.

Singleton, A.B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., Nussbaum, R., *et al.* (2003). α -Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302, 841.

- Sivanathan, V., y Hochschild, A. (2012). Generating extracellular amyloid aggregates using *E. coli* cells. *Genes Dev* 26, 2659-2667.
- Sivanathan, V., y Hochschild, A. (2013). A bacterial export system for generating extracellular amyloid aggregates. *Nat Protoc* 8, 1381-1390.
- Sonati, T., Reimann, R.R., Falsig, J., Baral, P.K., O'Connor, T., Hornemann, S., Yaganoglu, S., Li, B., Herrmann, U.S., Wieland, B., *et al.* (2013). The toxicity of anti-prion antibodies is mediated by the flexible tail of the prion protein. *Nature* 501, 102-106.
- Sorce, S., Nuvolone, M., Keller, A., Falsig, J., Varol, A., Schwarz, P., Bieri, M., Budka, H., y Aguzzi, A. (2014). The role of the NADPH oxidase NOX2 in prion pathogenesis. *PLoS Pathog* 10: e1004531.
- Spivak, M., Weston, J., Bottou, L., Kall, L., y Noble, W.S. (2009). Improvements to the percolator algorithm for Peptide identification from shotgun proteomics data sets. *J Proteome Res* 8, 3737-3745.
- Stewart, E.J., Madden, R., Paul, G., y Taddei, F. (2005). Aging and death in an organism that reproduces by morphologically symmetric division. *PLoS Biol* 3, e45.
- Tanaka, M., Collins, S.R., Toyama, B.H., y Weissman, J.S. (2006). The physical basis of how prion conformations determine strain phenotypes. *Nature* 442, 585-589.
- Tank, E.M., Harris, D.A., Desai, A.A., y True, H.L. (2007). Prion protein repeat expansion results in increased aggregation and reveals phenotypic variability. *Mol Cell Biol* 27, 5445-5455.
- Ter-Avanesyan, M.D., Dagkesamanskaya, A.R., Kushnirov, V.V., y Smirnov, V.N. (1994). The SUP35 omnipotent suppressor gene is involved in the maintenance of the non-Mendelian determinant [psi+] in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 137, 671-676.
- Tessier, P.M., y Lindquist, S. (2009). Unraveling infectious structures, strain variants and species barriers for the yeast prion [PSI+]. *Nat Struct Mol Biol* 16, 598-605.
- Thackray, A.M., Muhammad, F., Zhang, C., Denyer, M., Spiropoulos, J., Crowther, D.C., y Bujdoso, R. (2012). Prion-induced toxicity in PrP transgenic *Drosophila*. *Exp Mol Pathol* 92, 194-201.
- Torreira, E., Moreno-Del Álamo, M., Fuentes-Pérez, M.E., Fernández, C., Martín-Benito, J., Moreno-Herrero, F., Giraldo, R., y Llorca, O. (2015). Amyloidogenesis of bacterial prionoid RepA-WH1 recapitulates dimer to monomer transitions of RepA in DNA replication initiation. *Structure* 23, 183-189.
- Toyama, B.H., y Weissman, J.S. (2011). Amyloid structure: conformational diversity and consequences. *Annu Rev Biochem* 80, 557-585.
- Treusch, S., Cyr, D.M., y Lindquist, S. (2009). Amyloid deposits: protection against toxic protein species? *Cell Cycle* 8, 1668-1674.
- True, H.L., Berlin, I., y Lindquist, S.L. (2004). Epigenetic regulation of translation reveals hidden genetic variation to produce complex traits. *Nature* 431, 184-187.
- Tuite, M.F., y Cox, B.S. (2003). Propagation of yeast prions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 878-890.
- Tycko, R. (2006). Solid-state NMR as a probe of amyloid structure. *Protein Pept Lett* 13, 229-234.
- Ueda, K., Yamamoto, Y., Ogawa, K., Abo, T., Inokuchi, H., y Aiba, H. (2002). Bacterial SsrA system plays a role in coping with unwanted translational readthrough caused by suppressor tRNAs. *Genes Cells* 7, 509-519.

- Uden, G., y Bongaerts, J. (1997). Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: Energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim Biophys Acta* 1320, 217-234.
- Uno, M., Ito, K., y Nakamura, Y. (1996). Functional specificity of amino acid at position 246 in the tRNA mimicry domain of bacterial release factor 2. *Biochimie* 78, 935-943.
- Villar-Piqué, A., Espargaró, A., Sabate, R., de Groot, N.S., y Ventura, S. (2012). Using bacterial inclusion bodies to screen for amyloid aggregation inhibitors. *Microb Cell Fact* 11, 55.
- Vinella, D., Loiseau, L., Ollagnier de Choudens, S., Fontecave, M., y Barras, F. (2013). *In vivo* [Fe-S] cluster acquisition by IscR and NsrR, two stress regulators in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 87, 493-508.
- von der Haar, T., Josse, L., Wright, P., Zenthon, J., y Tuite, M.F. (2007). Development of a novel yeast cell-based system for studying the aggregation of Alzheimer's disease-associated Abeta peptides in vivo. *Neurodegener Dis* 4, 136-147.
- Wadsworth, J.D., Hill, A.F., Beck, J.A., y Collinge, J. (2003). Molecular and clinical classification of human prion disease. *Br Med Bull* 66, 241-254.
- Wang, F., Wang, X., Yuan, C.G., y Ma, J. (2010). Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein. *Science* 327, 1132-1135.
- Wang, L., Maji, S.K., Sawaya, M.R., Eisenberg, D., y Riek, R. (2008). Bacterial inclusion bodies contain amyloid-like structure. *PLoS Biol* 6, e195.
- Wang, Q., Sun, T., Xu, J., Shen, Z., Briggs, S.P., Zhou, D., y Wang, L. (2014). Response and adaptation of *Escherichia coli* to suppression of the amber stop codon. *Chembiochem* 15, 1744-1749.
- Watts, J.C., y Prusiner, S.B. (2014). Mouse models for studying the formation and propagation of prions. *J Biol Chem* 289, 19841-19849.
- Weber, H., Polen, T., Heuveling, J., Wendisch, V.F., y Hengge, R. (2005). Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: σ^S -dependent genes, promoters and sigma factor selectivity. *J Bacteriol* 187, 1591-1603.
- Weiss, S., Proske, D., Neumann, M., Groschup, M.H., Kretzschmar, H.A., Famulok, M., y Winnacker, E.L. (1997). RNA aptamers specifically interact with the prion protein PrP. *J Virol* 71, 8790-8797.
- Weixlbaumer, A., Jin, H., Neubauer, C., Voorhees, R.M., Petry, S., Kelley, A.C., y Ramakrishnan, V. (2008). Insights into translational termination from the structure of RF2 bound to the ribosome. *Science* 322, 953-956.
- White, J.G., Southgate, E., Thomson, J.N., y Brenner, S. (1986). The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 314, 1-340.
- Wickner, R.B. (1994). [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 264, 566-569.
- Wickner, R.B., Dyda, F., y Tycko, R. (2008). Amyloid of Rnq1p, the basis of the [PIN+] prion, has a parallel in-register beta-sheet structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2403-2408.
- Wickner, R.B., Edskes, H.K., Roberts, B.T., Pierce, M.M., Baxa, U., y Ross, E. (2001). Prions beget prions: the [PIN+] mystery! *Trends Biochem Sci* 26, 697-699.
- Wickner, R.B., Edskes, H.K., Shewmaker, F., y Nakayashiki, T. (2007). Prions of fungi: inherited structures and biological roles. *Nat Rev Microbiol* 5, 611-618.

- Wickner, R.B., Masison, D.C., y Edskes, H.K. (1995). [PSI] and [URE3] as yeast prions. *Yeast* *11*, 1671-1685.
- Willander, H., Askarieh, G., Landreh, M., Westermarck, P., Nordling, K., Keranen, H., Hermansson, E., Hamvas, A., Nogee, L.M., Bergman, T., *et al.* (2012). High-resolution structure of a BRICHOS domain and its implications for anti-amyloid chaperone activity on lung surfactant protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 2325-2329.
- Wiltzius, J.J., Landau, M., Nelson, R., Sawaya, M.R., Apostol, M.I., Goldschmidt, L., Soriaga, A.B., Cascio, D., Rajashankar, K., y Eisenberg, D. (2009). Molecular mechanisms for protein-encoded inheritance. *Nat Struct Mol Biol* *16*, 973-978.
- Winkler, J., Seybert, A., Konig, L., Pruggnaller, S., Haselmann, U., Sourjik, V., Weiss, M., Frangakis, A.S., Mogk, A., y Bukau, B. (2010). Quantitative and spatio-temporal features of protein aggregation in *Escherichia coli* and consequences on protein quality control and cellular ageing. *EMBO J* *29*, 910-923.
- Wittmann, C.W., Wszolek, M.F., Shulman, J.M., Salvaterra, P.M., Lewis, J., Hutton, M., y Feany, M.B. (2001). Tauopathy in *Drosophila*: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science* *293*, 711-714.
- Wong, C., Xiong, L.W., Horiuchi, M., Raymond, L., Wehrly, K., Chesebro, B., y Caughey, B. (2001). Sulfated glycans and elevated temperature stimulate PrP(Sc)-dependent cell-free formation of protease-resistant prion protein. *EMBO J* *20*, 377-386.
- Woodmansee, A.N., e Imlay, J.A. (2002). Reduced flavins promote oxidative DNA damage in non-respiring *Escherichia coli* by delivering electrons to intracellular free iron. *J Biol Chem* *277*, 34055-34066.
- Yang, F., Lim, G.P., Begum, A.N., Ubeda, O.J., Simmons, M.R., Ambegaokar, S.S., Chen, P.P., Kaye, R., Glabe, C.G., Frautschi, S.A., *et al.* (2005). Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J Biol Chem* *280*, 5892-5901.
- Yokoyama, T., Takeuchi, A., Yamamoto, M., Kitamoto, T., Ironside, J.W., y Morita, M. (2011). Heparin enhances the cell-protein misfolding cyclic amplification efficiency of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett* *498*, 119-123.
- Zacharias, D.A., Violin, J.D., Newton, A.C., y Tsien, R.Y. (2002). Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* *296*, 913-916.
- Zavialov, A.V., Mora, L., Buckingham, R.H., y Ehrenberg, M. (2002). Release of peptide promoted by the GGQ motif of class 1 release factors regulates the GTPase activity of RF3. *Mol Cell* *10*, 789-798.
- Zhang, C., Jackson, A.P., Zhang, Z.R., Han, Y., Yu, S., He, R.Q., y Perrett, S. (2010). Amyloid-like aggregates of the yeast prion protein ure2 enter vertebrate cells by specific endocytotic pathways and induce apoptosis. *PLoS One* *5*.
- Zhang, J., Wang, K., Guo, Y., Shi, Q., Tian, C., Chen, C., Gao, C., Zhang, B.Y., y Dong, X.P. (2012). Heat shock protein 70 selectively mediates the degradation of cytosolic PrPs and restores the cytosolic PrP-induced cytotoxicity via a molecular interaction. *Virology* *9*, 303.
- Zhang, S., Rydén-Aulin, M., Kirsebom, L.A., e Isaksson, L.A. (1994). Genetic implication for an interaction between release factor one and ribosomal protein L7/L12 in vivo. *J Mol Biol* *242*, 614-618.
- Zhou, C., Slaughter, B.D., Unruh, J.R., Guo, F., Yu, Z., Mickey, K., Narkar, A., Ross, R.T., McClain, M., y Li, R. (2014). Organelle-based aggregation and retention of damaged proteins in asymmetrically dividing cells. *Cell* *159*, 530-542.

Zou, W.Q., Puoti, G., Xiao, X., Yuan, J., Qing, L., Cali, I., Shimoji, M., Langeveld, J.P., Castellani, R., Notari, S., *et al.* (2010). Variably protease-sensitive prionopathy: a new sporadic disease of the prion protein. *Ann Neurol* 68, 162-172.

XI. ANEXOS

Aggregation Interplay between Variants of the RepA-WH1 Prionoid in *Escherichia coli*

Laura Molina-García, Rafael Giraldo

Department of Cellular and Molecular Biology, Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, Spain

The N-terminal domain (winged-helix domain, or WH1) of the *Pseudomonas* pPS10 plasmid DNA replication protein RepA can assemble into amyloid fibers *in vitro* and, when expressed in *Escherichia coli*, leads to a unique intracellular amyloid proteinopathy by hampering bacterial proliferation. RepA-WH1 amyloidosis propagates along generations through the transmission of aggregated particles across the progeny, but it is unable to propagate horizontally as an infectious agent and is thus the first synthetic bacterial prionoid. RepA-WH1 amyloidosis is promoted by binding to double-stranded DNA (dsDNA) *in vitro*, and it is modulated by the Hsp70 chaperone DnaK *in vivo*. Different mutations in the *repA*-WH1 gene result in variants of the protein with distinct amyloidogenic properties. Here, we report that intracellular aggregates of the hyperamyloidogenic RepA with an A31V change in WH1 [RepA-WH1(A31V)] are able to induce and enhance the growth *in vivo* of new amyloid particles from molecules of wild-type RepA-WH1 [RepA-WH1(WT)], which otherwise would remain soluble in the cytoplasm. In contrast, RepA-WH1(Δ N37), a variant lacking a clear amyloidogenic sequence stretch that aggregates as conventional inclusion bodies (IBs), can drive the aggregation of the soluble protein into IBs only if expressed at high molar ratios over RepA-WH1(WT). The cytotoxic bacterial intracellular prionoid RepA-WH1 thus exhibits a hallmark feature of amyloids, as characterized in eukaryotes: cross-aggregation between variants of the same protein.

Amyloid proteinopathies are neurodegenerative and systemic diseases with increasing incidence in human population and are currently one of the main burdens associated with aging. Although protein amyloidoses have broad clinical manifestations, they share an etiology: the accumulation of insoluble aggregates of a particular protein, either misfolded or posttranslationally processed, which are made of crossed β -sheet assemblies, the signature three-dimensional structure of amyloids (1). Oligomers of an amyloidogenic protein, in their process toward assembling as fibers, seem to be the most toxic amyloid species, acting either directly by targeting membranes or depleting essential cell factors through coaggregation or, indirectly, by contributing to generate reactive oxygen species (2). Apart from studies carried out with human cells in culture and with mice, which have uncovered many pathways possibly linked to disease, there is a need for simpler model systems that provide further insight into the essentials of amyloidosis. These include *Drosophila* and *Caenorhabditis* animal models and, among microorganisms, yeast. Fungal prions have indeed contributed to our knowledge about the molecular basis for amyloid assembly and propagation (3), but they are not optimal models for disease because they behave as selectable epigenetic determinants of non-Mendelian inheritance, conferring beneficial phenotypic traits to their carriers (4). Similarly, a number of natural amyloids have been recently identified in bacteria and found to be involved in scaffolding extracellular biofilms or as inert, mobilizable intracellular deposits of toxic peptides, such as microcins (5). The unsurpassed potential of *Escherichia coli* as a model system in biology has also been exploited to study the heterologous aggregation of amyloidogenic proteins, such as the *Saccharomyces cerevisiae* prion Sup35p ([PSI⁺]) or Alzheimer's A β peptides, which aggregate as intracellular inclusion bodies (IBs) (6, 7).

We have recently found that when the N-terminal winged-helix domain (WH1) of RepA, a plasmid DNA replication initiator/transcriptional repressor, includes a mutation (A31V) that has

repeatedly been found to naturally enhance plasmid replication *in vivo* (8), it assembles into amyloid fibers *in vitro* upon allosteric binding to small double-stranded DNA (dsDNA) effector molecules (9, 10). Furthermore, fusions of RepA-WH1(A31V) to a fluorescent protein tag allowed tracking of the aggregation of the protein in the cytoplasm of *E. coli*, revealing a drastic reduction in cell proliferation upon protein aggregation (11). In addition to such toxicity, RepA-WH1(A31V) aggregates differ from conventional IBs in having a higher degree of staining with a specific amyloidotropic fluorophore and in exhibiting dynamic interconversion between distinct amyloid species, which resemble prion strains (12). The latter process is modulated by the Hsp70 chaperone DnaK that generates oligomeric RepA-WH1(A31V) particles that are readily transferred to the progeny during bacterial division (12). Being noninfectious but vertically transmissible from mother to daughter cells, RepA-WH1 qualifies as the first entirely bacterial prionoid (13).

In this work, by means of the pairwise coexpression of *repA*-WH1 alleles coding for proteins with diverse amyloidogenic properties, which were tracked through epitope tags and fusions to fluorescent proteins with distinct colors, we have addressed how they mutually influence their aggregation *in vivo*. We have found that the interplay between their intrinsic aggregation tendencies, expression levels, and intermolecular contacts determines the solubility versus aggregation balance for each RepA-WH1 variant.

Received 4 February 2014 Accepted 24 April 2014

Published ahead of print 2 May 2014

Address correspondence to Rafael Giraldo, rgiraldo@cib.csic.es.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JB.01527-14

Semi-denaturing Detergent Agarose Gel Electrophoresis (SDD-AGE)

Laura Molina-García¹ and Fátima Gasset-Rosa^{2*}

¹Department of Cellular and Molecular Biology, Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC, Madrid, Spain; ²Department of Neurosciences, University of California, San Diego, USA

*For correspondence: fgasset@ucsd.edu

[Abstract] Pathological proteins in neurodegenerative diseases suffer a conformational change to a misfolded amyloid state. Such pathological event leads to the aggregation of these proteins that indefinitely propagates as an altered form of itself, and harbor prion-like properties (Wickner, 1994; Prusiner, 2012). In addition to diseases, prions can also have beneficial adaptive roles in lower eukaryotes (in fungi and yeast) (Eaglestone *et al.*, 1999; True *et al.*, 2004; Coustou *et al.*, 1999). Besides separating polymers from their precursor soluble monomers, another particular difficulty of the study of amyloid proteins is to resolve the heterogeneity of the aggregates, since these usually exhibit a variable degree of polymorphism. Semi-denaturing detergent agarose gel electrophoresis (SDD-AGE) is a technique that takes advantage of both the property of prions and prion-like polymers to be highly resistant to solubilization by SDS detergent, and the large pores sizes of agarose, that allow the resolution of high molecular weight complexes. In this method, we describe in detail how this technique can be used to characterize heterogeneous aggregation in bacteria and yeast (Gasset-Rosa *et al.*, 2014; Molina-García and Giraldo, 2014), and further be applied to study the aggregation pattern of proteins that become prone to aggregation through genetic manipulation.

Materials and Reagents

1. Bacteria: Gram negative *Escherichia coli* (*E. coli*) or yeast *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)

Notes:

Amyloids exist in E. coli and S. cerevisiae. In both organism amyloids can be functional. In E. coli the most well know example is the curli protein which is assembled in the extracellular medium and allow the attachment of the bacteria to the surface and sustain the formation of biofilms (Chiti and Dobson, 2006; Chapman et al., 2002).

In S. cerevisiae, amyloids confer to cells selective advantage under certain physiological conditions and they aren't harmful (Chien et al., 2004; Shorter and Lindquist, 2005; Wickner et al., 2007), a few examples are Sup35p y Ure2p, Rnq1p. The conversion of Sup35 from soluble to the amyloid state drives the reduction of translation termination

Sistema bacteriano para diagnóstico y terapia de proteinopatías amiloides

El CSIC ha desarrollado un sistema bacteriano eficiente para la identificación *in vivo* de péptidos amiloidogénicos e inhibidores de la agregación amiloide de proteínas. Este sistema puede ser de aplicación en el diagnóstico y terapia de proteinopatías amiloides. Se buscan compañías interesadas en aplicar y comercializar esta nueva tecnología de cribado bajo licencia de patente.

Oferta de Licencia de Patente

Nueva herramienta de diagnóstico de Amiloidosis

Los agregados amiloides de proteínas son agentes causales de un alto número de enfermedades tanto sistémicas (diabetes tipo II, amiloidosis relacionada con hemodiálisis) como neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, Huntington, priones), en conjunto denominadas proteinopatías amiloides o amiloidosis. Esto hace que sea interesante tener sistemas que permitan monitorizar e intervenir sobre la amiloidogénesis.

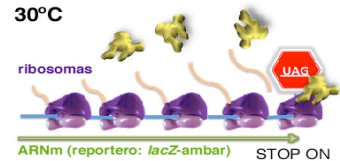
En la actualidad es acuciante el disponer de sistemas para identificar *in vivo* de forma fiable, rápida y sencilla, péptidos amiloidogénicos y compuestos moduladores de la agregación amiloide de proteínas.

Los investigadores han desarrollado un sistema bacteriano sintético, basado en la agregación de un factor requerido para la terminación de la traducción de proteínas, que permite identificar experimentalmente *in vivo* secuencias amiloides de cualquier proteoma, incluyendo el humano, de interés biomédico o biotecnológico. Este sistema permite además valorar la acción de diversas moléculas como potenciales inhibidoras de la agregación amiloide simplificando, conforme al criterio de reemplazo, el ensayo de fármacos para su posterior verificación en sistemas celulares o animales más complejos.

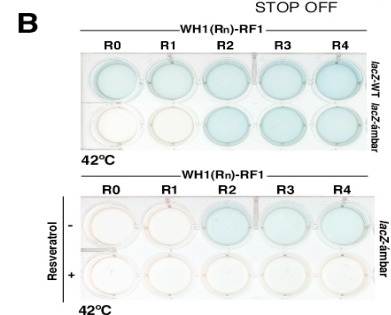
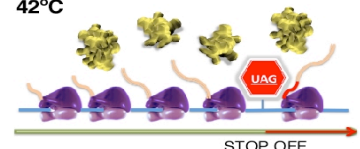
Principales aplicaciones y ventajas

- El sistema permite, además de monitorizar *in vivo* el potencial amiloide de cualquier secuencia peptídica, identificar y clasificar compuestos inhibidores de amiloidosis.
- Permite valorar *in vivo* el grado de toxicidad dosis-dependiente de los compuestos ensayados de manera rápida, sencilla y económica.
- Es un sistema sensible para clasificar las moléculas ensayadas en función de su actividad inhibidora de formación de agregados amiloides.
- Por las características propias del crecimiento bacteriano, es un sistema de diagnóstico y selección rápido.

A fusión amiloide X-RF1: BLANCO (solubles) 30°C



fusión amiloide X-RF1: AZUL (agregadas) 42°C



- A) Fundamento del sistema: balance agregación (*arriba*) / solubilidad (*abajo*) de fusiones entre amiloides y RFI en la traducción de un gen reportero.
- B) Resultados de un cribado en placas: coloración azul-agregación / blanca-solubilidad (*arriba*); efecto anti-amiloide del resveratrol (*abajo*).

Estado de la patente

Patente prioritaria solicitada

Para más información, por favor contacte con

Dra. Alejandra García Alonso
 Centro de Investigaciones
 Biológicas CIB-CSIC
 Vicepresidencia Adjunta de
 Transferencia de Conocimiento del
 CSIC
 Tel.: + 34 – 91 8373112 ext. 4255
 Correo-e: alejandra.garcia@csic.es



