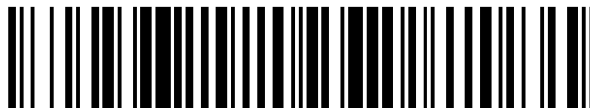


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 418 459**

21 Número de solicitud: 201190025

51 Int. Cl.:

G01N 33/542 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

09.10.2009

43 Fecha de publicación de la solicitud:

13.08.2013

71 Solicitantes:

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
(100.0%)
director de la oficina de valorització i patents de
la UABedifici eureka, campus universitari UAB
08193 Bellaterra, cerdanyola del vallès
(Barcelona) ES**

72 Inventor/es:

**VENTURA ZAMORA, Salvador;
AVILÉS PUIGVERT, Francesc Xavier y
MORELL FERNÁNDEZ, Montserrat**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **RELACIONANDO AGREGACIÓN PROTEICA CON SUPERVIVENCIA DE LEVADURA**

57 Resumen:

Relacionando agregación proteica con supervivencia de levadura.

La invención se refiere a métodos para la identificación de compuestos capaces de prevenir la agregación de polipéptidos propensos a la agregación basados en el uso de proteínas de fusión. Las proteínas de fusión comprenden la proteína de interés y una enzima que es capaz de metabolizar un agente tóxico para la célula. Si el compuesto candidato previene la agregación de la proteína de fusión, el enzima se mantiene soluble y en forma activa, evitando así el efecto tóxico en la célula e incrementando la viabilidad celular respecto a la de células no expuestas al compuesto candidato. La invención también proporciona diferentes polipéptidos que contienen un polipéptido con tendencia a agregar y una enzima, y describe la utilización de los mismos.

ES 2 418 459 A2

DESCRIPCIÓN

RELACIONANDO AGREGACIÓN PROTEICA CON SUPERVIVENCIA DE LEVADURA

5 OBJETO DE LA INVENCION

En la presente invención se relaciona la agregación proteica con la supervivencia de levaduras.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10

En los últimos años, la agregación de proteínas ha tomado una importancia creciente y es uno de los tópicos más estudiados en biología y medicina. Una gran cantidad de estudios sugieren que el mal plegamiento de proteínas y la formación de agregados amiloides insolubles es la causa fundamental de algunas enfermedades como el
15 Alzheimer (A), el Parkinson (P), la diabetes tipo II y las encefalopatías espongiiformes entre otras (Dobson, C.M. *Protein-misfolding diseases: Getting out of shape. Nature* **418**, 729 - 730 (2002)). Un punto en común de estas enfermedades es la presencia de depósitos de agregados proteicos en los órganos internos que interfieren con la función celular normal, algunas veces de manera letal. Además, la agregación proteica es uno de los
20 mayores problemas en la expresión de proteínas, reduciendo el número de proteínas que pueden ser obtenidas de manera recombinante y dificultando la investigación en áreas como la genómica estructural y la proteómica. Por lo tanto, existe un gran interés en el desarrollo de métodos que detecten la agregación proteica y que permitan la selección de genes, compuestos químicos o condiciones de cultivo que permitan modular la
25 agregación de proteínas.

30

Hasta la actualidad, diferentes ensayos han sido desarrollados para estudiar y detectar la agregación proteica en células procariontas, específicamente en *Escherichia coli* (Maxwell, K.L., Mittermaier, A.K., Forman-Kay, J.D. & Davidson, A.R. *A simple in vivo assay for increased protein solubility, Protein Sci* **8**, 1908-1911 (1999)), (Waldo, G.S., Standish, B.M., Berendzen, J. & Terwilliger, T.C. *Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. Nat Biotechnol* **17**, 691-695 (1999)), (Wigley, W.C., Stidham, R.D., Smith, N.M., Hunt, J.F. & Thomas, P.J. *Protein solubility and folding monitored in vivo by structural complementation of a genetic marker protein. Nat*

Biotechnol **19**, 131-136 (2001)). La mayoría de estos métodos se basan en la capacidad de las proteínas que agregan de causar el mal plegamiento de otra proteína marcador fusionada a ellas. De esta manera, diferentes proteínas han sido usadas como marcadores, permitiendo la detección de la agregación proteica utilizando diferentes señales como
5 resistencia a ciertos antibióticos o la actividad β -galactosidasa.

Otra aproximación ha sido el uso de métodos basados en la detección de fluorescencia. Uno de los primeros en ser desarrollados utilizaba la proteína verde fluorescente (del inglés *Green Fluorescent protein*, GFP) como proteína de fusión (Waldo, G.S., Standish, B.M., Berendzen, J. & Terwilliger, T.C. *Rapid protein-folding
10 assay using green fluorescent protein. Nat Biotechnol* **17**, 691-695 (1999)). Esta técnica está basada en la existencia de una correlación de la fluorescencia detectada con la tendencia a agregar de la proteína fusionada en el extremo N-terminal de la GFP. Fusiones con proteínas que no agregan permiten un correcto plegamiento de la GFP. Por lo tanto, las colonias bacterianas que expresan estas fusiones exhiben fluorescencia verde.
15 Por el contrario, la GFP fusionada a proteínas con tendencia a agregar no se pliega correctamente y la emisión de fluorescencia disminuye significativamente. Como ejemplo, el péptido amiloide A β 42 se fusionó con la GFP y se expresó en bacterias. Después de mutar de manera aleatoria el péptido, mutaciones que reducen la tendencia del péptido A β 42 resultaron en una mayor fluorescencia en bacterias que contenían estas
20 fusiones.

La transferencia de energía por resonancia de la fluorescencia (FRET) ha sido también utilizada para crear un método *in vivo* para la detección del plegamiento proteico y de mutaciones que aumentan la estabilidad termodinámica de las proteínas en el
25 citoplasma de *E.coli* (Philipps, B., Hennecke, J. & Glockshuber, R. *FRET-based in vivo screening for protein folding and increased protein stability. J Mol Biol* **327**, 239-249 (2003)). El método se basa en la fusión de la proteína fluorescente verde (GFP) en el extremo C-terminal de la proteína X en estudio y la fusión de la proteína fluorescente azul (del inglés, *Blue Fluorescent Protein* BFP) en el extremo N-terminal. Una
30 transferencia FRET eficiente entre la proteína BFP y GFP solo se observará *in vivo* si la proteína X está bien plegada y permite la aproximación de las dos proteínas fluorescentes.

Por el contrario, la señal se pierde si BFP y GFP están alejadas debido al mal plegamiento o degradación de la proteína X.

Otros métodos utilizan la actividad intracelular de la enzima β -galactosidasa como
5 señal de solubilidad proteica o agregación. Este método es una adaptación del tradicional
ensayo de complementación proteica (Wigley, W.C., Stidham, R.D., Smith, N.M., Hunt,
J.F. & Thomas, P.J. *Protein solubility and folding monitored in vivo by structural
complementation of a genetic marker protein. Nat Biotechnol* **19**, 131-136 (2001)). Cada
monómero de la enzima tetramérica se puede dividir en dos fragmentos, el más pequeño
10 (α) y el más grande (ω). En presencia del fragmento α , los dímeros de los fragmentos ω se
estabilizan y forman un tetrámero con actividad enzimática. Si la proteína de interés es
fusionada al fragmento α , el reparto del fragmento α entre la fracción soluble e insoluble
conllevará una reducción de la actividad β -galactosidasa, obteniendo información sobre la
solubilidad de la proteína diana.

15 Otro método ha sido desarrollado después de la identificación de genes
específicos que responden a la agregación proteica en bacterias. En este método el
promotor del gen responsable de esta actividad (*IbpAB*) se fusiona a la proteína β -
galactosidasa para cuantificar la respuesta del promotor al mal plegamiento intracelular
de proteínas (Lesley, S.A., Graziano, J., Cho, C.Y., Knuth, M.W. & Klock, H.E. *Gene
20 expression response to misfolded protein as a screen for soluble recombinant protein.
Protein Eng* **15**, 153-160 (2002)). De esta manera, la expresión de la proteína β -
galactosidasa (y su actividad) se vincula a la agregación de la proteína diana dentro de la
célula. Recientemente ha sido demostrada la utilidad de este método para evaluar los
diferentes factores que influyen en la solubilidad proteica durante la expresión
25 recombinante de proteínas en *E.coli* (Schultz, T., Martinez, L. & de Marco, A. *The
evaluation of the factors that cause aggregation during recombinant expression in E. coli
is simplified by the employment of an aggregation-sensitive reporter. Microb Cell Fact* **5**,
28 (2006))

30 La resistencia a cloramfenicol también ha sido usada para detectar mutantes
solubles de una proteína con tendencia a la agregación en *E. coli* (Maxwell, K.L.,
Mittermaier, A.K., Forman-Kay, J.D. & Davidson, A.R. *A simple in vivo assay for
increased protein solubility. Protein Sci* **8**, 1908-1911 (1999)). En este caso, la proteína

que ofrece la señal es la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). La resistencia a altos niveles de cloramfenicol será equivalente a la expresión de una variante soluble de la proteína de interés. La selección se lleva a cabo creciendo las bacterias en un medio con una alta concentración de antibiótico.

5 Todos estos métodos se basan en el uso de bacterias y por lo tanto, sufren de las desventajas relacionadas con la expresión de proteínas heterólogas en bacterias.

WO2007/103788 describe un método para la determinación de la agregación proteica en levadura. Está basado en la capacidad del factor Sup35p para formar agregados
10 amiloides. Este factor manifiesta un fenotipo priónico llamado [*PSI+*] y está formado por tres dominios. El dominio N-terminal (N) es dispensable para la viabilidad y es necesario y suficiente para las propiedades prionicas de Sup35p. La función del dominio intermedio (M) no está determinada y el dominio C-terminal (RF) lleva a cabo el fin de la traducción proteica y es esencial para la viabilidad.

15

En este método, la actividad del factor Sup35p (NMRF) se mide *in vivo* examinando la eficiencia con la que la síntesis proteica se termina en un codón de terminación stop prematuro. El ensayo usa el alelo *ade1-14*. Cepas que presentan esta mutación y que expresan el NMRF activo producen una versión truncada e inactiva de la
20 proteína Ade1p, y como consecuencia, no pueden crecer en un medio sintético sin adenina (-Ade), mientras que normalmente crecen en medio suplementado con adenina (+Ade). Además, estas células acumulan un intermediario metabólico rojizo que forma parte de la vía de síntesis de la adenina cuando crecen en un medio rico. No obstante, si la eficiencia de Sup35 de poner fin a la traducción en el codón prematuro disminuye, las
25 células ganan la habilidad de crecer en medio -Ade (se convierten en Ade+) y no acumulan el pigmento rojo. Por ejemplo, células expresando el Sup35p completo con los tres dominios son blancas y Ade+ cuando este está en la forma priónica agregada [*PSI+*]. Células expresando la forma funcional y no agregada del Sup35p al que le falta el dominio N-terminal (MRF) son rojas y Ade-. Este sistema distingue perfectamente entre el
30 monómero activo y las formas agregadas no funcionales de NMRF. Puede ser aplicado al estudio de la agregación de una proteína como el péptido amiloide A β 42. Si el péptido con tendencia agregacional se fusiona al fragmento MRF, las células de levadura son

blancas y crecen en $-Ade$ (son Ade^+), mientras que mutaciones que incrementan la solubilidad de $A\beta_{42}$ dan lugar a colonias con un color rosado en medio rico y convierte las células en Ade^- . No obstante, este método no es totalmente adecuado para el estudio del plegamiento y la agregación proteica ya que se trata de un ensayo negativo en el que
5 las levaduras que expresan la proteína soluble son precisamente aquellas que no sobreviven en el medio utilizado para la selección. Por este motivo existe la necesidad de encontrar un método que nos permita estudiar el plegamiento proteico y encontrar agentes terapéuticos para las enfermedades asociadas a la oligomerización proteica, ya sea a través de la regulación del plegamiento proteico o mediante la inhibición de la
10 agregación, utilizando un ensayo positivo, donde las células viables sean aquellas en las que no tiene lugar la agregación proteica y que, por tanto permita un análisis mas directo y sencillo y su uso eficiente en ensayos a gran escala.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

15

El método desarrollado está relacionado con el acoplamiento de un de un fenotipo fácilmente medible, como la supervivencia celular, con la agregación de proteínas utilizando la levadura como modelo de organismo eucariota. Está basado en la fusión de
20 la proteína diana la enzima dihidrofolato reductasa humana (h-DHFR). La DHFR es un enzima clave en la síntesis de timidina que cataliza la reducción del 7,8-dihidrofolato a 5,6,7,8-tetrahidrofolato utilizando el NADPH como coenzima.

El enzima DHFR es esencial en el metabolismo del carbono en eucariotas y
25 procariotas y por tanto esencial para la supervivencia celular. Su actividad puede ser específicamente inhibida con el compuesto metotrexato (MTX). En este trabajo se utiliza la observación de que las levaduras se hacen resistentes al MTX si estas expresan altos niveles de DHFR. Se pueden utilizar asimismo otros inhibidores específicos de DHFR, (como por ejemplo el trietoprim en el caso de DHFR bacteriana).

30

Esta proteína es muy soluble y, en el método desarrollado en la invención, puede expresarse en elevadas concentraciones lo que permite la supervivencia de las levaduras en medios que contengan elevadas concentraciones de MTX que en otras condiciones

serian letales. Por lo tanto, este método se basa en el hecho de que la fusión de la h-DHFR a una proteína con tendencia a agregar puede inactivar la actividad DHFR y volver la levadura que expresa esta fusión sensible a la presencia de MTX.

5 En principio, este hecho permitiría el diseño de un método para detectar el correcto plegamiento proteico dentro de la levadura, basado en la reversión de la inhibición del crecimiento celular ocasionado por el MTX. También se podría usar para valorar el efecto de diferentes factores (mutaciones, genes, compuestos químicos o condiciones de crecimiento) sobre la agregación proteica. Para demostrar la aplicabilidad
10 del ensayo, diferentes proteínas con tendencia a agregar: el péptido A β vinculado al Alzheimer (A β), las repeticiones de glutamina en la proteína del Huntington (poliQ) o la alfa-sinucleína (α -Sin) han sido usadas como modelo.

El método descrito a continuación tiene como objetivo la evaluación sencilla de
15 los efectos de factores intrínsecos y extrínsecos en la agregación proteica. Está basado en la relación entre la actividad intracelular y la solubilidad de la proteína recombinante h-DHFR y el crecimiento celular en presencia de concentraciones letales de MTX. Además, el uso de fMTX (un MTX marcado con un compuesto fluorescente) permite evaluar la viabilidad celular y la localización de los agregados dentro de la célula de manera
20 simultanea.

En general, el método permite predecir la propensión a agregar de diferentes
variantes genéticas de tres polipéptidos que están relacionados con tres enfermedades
humanas importantes.

25 El sistema también puede convertirse en una plataforma para la identificación de compuestos que actúen contra la agregación proteica contribuyendo al desarrollo de nuevos compuestos terapéuticos. El uso de *S. Cerevisiae* es compatible con estas aplicaciones ya que se han desarrollado cepas que son permeables a drogas (por ejemplo,
30 *erg6 Δ*), aunque cualquier cepa con la capacidad de expresar los genes de interés puede ser utilizada.

De esta manera, un primer aspecto de la invención esta relacionada con un método para la identificación de compuestos que son capaces de disminuir la agregación de un polipéptido propenso a agregar que comprende:

- 5 (i) poner en contacto una o más células de levadura con un compuesto candidato, en donde las células de levadura expresan una proteína de fusión formada por el polipéptido con tendencia a agregar y la dihidrofolato reductasa humana (hDHFR) bajo condiciones en las cuales el polipéptido promueve en parte la deposición de hDHFR, dando lugar a la pérdida de la actividad intracelular de hDHFR y un
- 10 incremento de la sensibilidad de las células de levadura al MTX,
- (ii) añadir MTX o un inhibidor específico de la DHFR a las células de levadura del paso (i) en una cantidad que, sin la presencia de la actividad de la enzima hDHFR, que forma parte de la proteína de fusión utilizada en el paso (i), puede afectar negativamente la
- 15 viabilidad de las células de levadura, y
- (iii) determinar la viabilidad de las células de levadura donde un incremento de la viabilidad de las células respecto las células que no han sido expuestas al compuesto candidato indica que este compuesto es capaz de disminuir la agregación del polipéptido con tendencia a agregar.

20 En otro aspecto, la invención está relacionada con un polipéptido que se compone de un polipéptido con tendencia a la agregación y otro polipéptido con una actividad enzimática que es capaz de cambiar un compuesto que afecta de manera adversa el crecimiento celular de levadura, convirtiéndolo en un metabolito con una actividad nociva reducida.

25 En otros aspectos, la invención está relacionada con un polinucleótido que codifica un polipéptido de la invención, un vector que contiene un polinucleótido de la invención y una célula huésped que contiene un polipéptido, un polinucleótido o un vector de la invención.

30 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de una célula huésped de la invención para la identificación de compuestos que sean capaces de inhibir la agregación de un polipéptido con tendencia a agregar.

En un aspecto la invención esta relacionada con un método para la detección de un compuesto que disminuya la agregación de polipéptidos. El método se compone de (a) poner en contacto una o mas células de levadura con un compuesto candidato, donde las células de levadura expresan una proteína de fusión que se compone de un péptido con
5 tendencia a la agregación, como una proteína amiloidogénica, y una enzima que inhibe el compuesto tóxicotóxico que afecta a la viabilidad celular o que previene la acción del compuesto tóxicotóxico y su efecto la viabilidad celular (b) añadir el compuesto tóxicotóxico a la célula de levadura en una cantidad que, sin la actividad enzimática, afectara la viabilidad celular.

10

Usando este método, si un compuesto que disminuye la agregación de péptidos amiloidogénicos se añade en el medio, el enzima tendrá actividad e inhibirá el compuesto tóxicotóxico y por lo tanto, las células sobrevivirán.

15

Diferentes levaduras pueden ser usadas, por ejemplo *Saccharomyces uvae*, *Saccharomyces kluyveri*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces uvarum*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia kluyveri*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida sp.*, *Candida utilis*, *Candida cacaoi*, *Geotrichum sp.*, *Geotrichum fermentans*, y *Saccharomyces cerevisiae*. La preferida es
20 *Saccharomyces cerevisiae*, concretamente la cepa FY348, ya que la letalidad del MTX en ciertas concentraciones (y en presencia de 1mM de sulfonamida, que se usa para promover la penetración celular de MTX) puede ser superada en esta cepa con la expresión heteróloga de la DHFR humana bajo el control del promotor Gal110.

25

Diferentes grados de sensibilidad al MTX pueden ser correlacionados con la actividad intracelular del enzima. En el caso de la DHFR humana expresada como fusión a una proteína con tendencia a agregar, la proteína fusionada causara, al menos parcialmente, su agregación disminuyendo así la actividad intracelular y incrementando su sensibilidad al MTX. Por lo tanto, el estado de agregación de la proteína fusionada estará directamente
30 relacionada con la supervivencia de la levadura en presencia del MTX.

La invención está basada en el efecto que causa la fusión de una proteína amiloidogénica a la proteína h-DHFR: esta enzima se inactiva y sensibiliza las células que expresan este tipo de fusión a la presencia de MTX.

- 5 Por lo tanto, la fusión de una enzima a un polipéptido con tendencia a agregar inactiva esta enzima y sensibiliza las células que expresan este tipo de fusión a un compuesto que sería inhibido o inactivado por la enzima, tal y como es el MTX con la h-DFHR.

10 Convenientemente, los péptidos con tendencia a la agregación son péptidos amiloidogénicos como el péptido A β 42, repeticiones poliQ, o variantes de la α -sinucleína.

15 El método de la invención puede ser usado, en una realización preferida, para probar compuestos relacionados con la prevención o el del tratamiento de alguna de las siguientes enfermedades: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, Polineuropatía Amiloidea Familiar, Tautopatía, Enfermedades causadas por Expansión de Tripletas, encefalopatías espongiiformes y enfermedad de Huntington, todas ellas conocidas por ser causadas por la agregación de péptidos amiloidogénicos.

20 En caso de que se prefiera un marcador fluorescente, además de la viabilidad celular, el método puede medir fluorescencia, permitiendo un segundo control de las propiedades inhibitoras del compuesto a prueba. Una persona con experiencia puede reconocer diferentes marcadores fluorescentes que se pueden usar. El preferido es AlexaA.

25 En otro aspecto, la invención está relacionada con un kit útil para la identificación de compuestos que puedan inhibir la agregación proteica y que usa el método de la invención.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

30

Figura 1 muestra un esquema de los plásmidos usados en este ensayo. La proteína de interés fusionada con la DHFR se clona entre los sitios de restricción *ClaI* i *BglII* en el plásmido pESC.

Figura 2 muestra A) Visualización de la distribución intracelular del péptido A β 42 y el péptido A β 42(F19D) fusionados con la GFP y expresados en *S. cerevisiae* B) Co-tinción del núcleo celular con Hoechst (azul). El péptido agregado A β 42-GFP tiene una posición juxtenuclear.

Figura 3 muestra la viabilidad celular para levaduras expresando DHFR, el péptido A β 42-DHFR o el péptido A β 42 F19D-DHFR en diferentes temperaturas y concentraciones de MTX. Se muestran cuatro diluciones empezando con la misma cantidad de células.

Figura 4 muestra las cinéticas de crecimiento de la levadura FY834 expresando DHFR (círculos vacíos), el péptido A β 42-DHFR (cuadrados vacíos) o el péptido A β 42(F19D)-DHFR (círculos negros) en presencia de 0 μ M (izquierda) o 20 μ M (derecha) de MTX.

Figura 5 muestra el ensayo de retención en filtro para células expresando DHFR, A β 42(F19D)-DHFR o A β 42-DHFR. Los agregados proteicos son detectados por western blot usando un anticuerpo específico para la DHFR.

Figura 6 muestra que el inhibidor fluorescente (fMTX) permite la visualización de la distribución intracelular del péptido A β 42 y su mutante A β 42(F19D) fusionados a la DHFR.

Figure 7 muestra A) la microscopía de fluorescencia de las células de levadura expresando diferentes expansiones de polyQ (Q25, Q72 or Q103) fusionadas a la GFP B) Cinéticas de crecimiento de células de levadura expresando diferentes expansiones de polyQ (Q25, Q72 or Q103) fusionadas a la DHFR en presencia de 20 μ M MTX.

Figura 8 muestra que el uso de un inhibidor fluorescente de DHFR (fMTX) permite la visualización de la distribución intracelular de diferentes expansiones de poliQ fusionadas a DHFR.

Figura 9 muestra A) la microscopía de fluorescencia de las células de levadura expresando diferentes variedades de α -sinucleína fusionadas a GFP. B) Cinéticas de crecimiento de células de levadura expresando diferentes variedades de α -sinucleína fusionadas a DHFR en presencia de 100 μ M MTX.

5

Figura 10 muestra el uso de un inhibidor fluorescente de DHFR (fMTX) que permite la visualización de la distribución intracelular de diferentes expansiones de poliQ fusionadas a DHFR.

10 **Figura 11** muestra A) El reestablecimiento del crecimiento de las células *erg6 Δ* expresando A β 42-DHFR en la presencia de 20 μ M MTX, 1mM sulfanilamida y ciertas concentraciones de quercitina (30 μ M y 100 μ M) y Congo Red (10 μ M). El crecimiento esta normalizado respecto a 0 μ M de compuesto. Diferencias significativas están marcadas con un asterisco. B) Imágenes de microscopía de fluorescencia que muestran
15 que la expresión de A β 42-GFP causa la formación de agregados en las células *erg6 Δ* .

Figura 12 muestra A) muestra el crecimiento de la levadura FY834 co-expresando una chaperona y el péptido A β 42-DHFR en presencia de MTX en medio líquido. El crecimiento esta normalizado con la misma cepa expresando la DHFR. Diferencias
20 significativas están marcadas con un asterisco. B) Viabilidad celular de las diferentes cepas sobre-expresando una chaperona y DHFR o A β 42-DHFR. En cada caso, se muestran cuatro diluciones empezando con la misma cantidad de células.

Figura 13 muestra A) La microscopía de fluorescencia de diferentes cepas co-expresando
25 una chaperona y el péptido A β 42 fusionado a GFP. B) Análisis por Western Blot de las diferentes cepas co-expresando una chaperona y el péptido A β 42-DHFR. La concentración de A β 42-DHFR no varía debido a la expresión de la chaperona. Las diferentes bandas se correlacionan con los diferentes grados de oligomerización de A β 42-DHFR.

30

Figura 14 muestra el crecimiento de la levadura FY834 con una delección en una chaperona y expresando el péptido A β 42-DHFR en presencia de MTX en medio líquido.

El crecimiento está normalizado con la misma cepa expresando la DHFR. Diferencias significativas están marcadas con un asterisco.

Figura 15 muestra A) La microscopía de fluorescencia de diferentes cepas con delección de chaperonas que expresan el péptido A β 42 fusionado a GFP. B) Análisis por Western Blot de las diferentes cepas con una delección en una chaperona expresando A β 42-DHFR. Las bandas detectadas se correlacionan con los diferentes grados de oligomerización de la A β 42-DHFR.

10 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El objetivo de la invención es desarrollar un método para detectar la agregación proteica usando simultáneamente la supervivencia celular y la emisión de fluorescencia como marcadores. Se han usado como modelos proteínas con tendencia a la agregación proteica que están involucradas en enfermedades neurodegenerativas: el péptido β amiloide del Alzheimer (A β), repeticiones de glutamina en Huntington (poliQ) y alfa-sinucleína (α -Sin).

El segundo objetivo es estudiar la habilidad del método para detectar el efecto de diferentes factores que modulan la agregación proteica *in vivo*, como compuestos químicos, sobreexpresión de chaperonas, delección de chaperonas y condiciones de crecimiento (como por ejemplo, temperatura).

En este primer aspecto, la invención esta relacionada con un un método para la identificación de compuestos que son capaces de disminuir la agregación de un polipéptido propenso a agregar que comprende:

- (i) poner en contacto una o más células de levadura con un compuesto candidato, en donde las células de levadura expresan una proteína de fusión formada por el polipéptido con tendencia a agregar y la dihidrofolato reductasa humana (hDHFR) bajo condiciones en las cuales el polipéptido promueve en parte la deposición de hDHFR,

dando lugar a la pérdida de la actividad intracelular de hDHFR y un incremento de la sensibilidad de las células de levadura al MTX,

- (ii) añadir MTX o un inhibidor específico de la DHFR a las células de levadura del paso (i) en una cantidad que, sin la presencia de la actividad de la enzima hDHFR, que forma parte de la proteína de fusión utilizada en el paso (i), puede afectar negativamente la viabilidad de las células de levadura, y
- (iii) determinar la viabilidad de las células de levadura

5

donde un incremento de la viabilidad de las células respecto las células que no han sido expuestas al compuesto candidato indica que este compuesto es capaz de disminuir la agregación del polipéptido con tendencia a agregar.

10

El término “polipéptido con tendencia a la agregación proteica” se refiere a un polipéptido que es capaz de adoptar una conformación de hoja beta y/o que forma oligómeros, fibras y placas. Por ejemplo, los péptidos que tienen la potencialidad de asociarse y de formar fibras son proteínas fibrilares derivadas, por lo menos, de alguna de las siguientes proteínas precursoras: Tau, alfa-sinucleína, huntingtina, ataxina, superóxido dismutasa, TDP-43, SAA (proteína amiloide A de suero), AL (k o cadena ligera de Inmunoglobulinas), AH (Ig cadena pesada de inmunoglobulinas), TTR (Transtiretina, Prealbumina Sérica), AApo-A-1 (Apolipoproteína A1), AApoA2 (Apolipoproteína A2), AGeI (Gelsolina), ACys (Cistatina C), ALys (Lisozima), AFib (Fibrinógeno), Beta-amiloide (proteína precursora amiloide), Beta-amyloid2M (beta2 -microglobulina), APrP (proteína Prión), ACal (Procalcitonina), AIAPP (polipéptido amiloide de los islotes); APro (Prolactina), AIns (Insulina); AMed (Lactaderina); Aker (Kerato-epitelina); ALac (Lactoferrina), Abri (AbriPP), ADan (ADanPP); or AANP (péptido atrial natriuretico); para un revisión ver Skovronsky et al., Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 1 (2006), 151-70 and Buxbaum, Curr. Opin. Rheumatol. 16 (2003), 67-75). De forma preferente, el polipéptido con tendencia a la agregación es seleccionado entre un grupo formado por huntingtina mutante, beta-amiloide, tau, alfa-sinucleína, receptor andrógeno mutante, SOD1 mutante, ataxina mutante y similares. De forma más preferente, el polipéptido con tendencia a la agregación es un péptido amiloidogénico. De forma todavía más preferente el polipéptido es seleccionado entre el grupo de Aβ42, un péptido con repeticiones de poliglutamina y alfa-sinucleína o sus variantes.

15

20

25

30

El termino "células de levadura" usado aquí incluye levadura ascosporogenous (Endomycetales), levadura basidiosporogenous, y levaduras pertenecientes al grupo Fungi Imperfecti (Blastomycetes). Como la clasificación de levaduras puede cambiar en un futuro, para esta invención, las levaduras tienen que ser definidas tal y como están descritas en *Biology And Activities of Yeast* (Skinner, F. A., Passmore, S. M., and Davenport, R. R., eds, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9, 1980). De forma preferente, la célula de levadura huésped es una célula *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Yarrowia*. De forma todavía más preferente, la célula huésped es seleccionada entre las siguientes:

5
10
15

Saccharomyces cerevisiae, *Saccharomyces uvae*, *Saccharomyces kluyveri*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces uvarum*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia kluyveri*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida sp.*, *Candida utilis*, *Candida cacaoi*, *Geotrichum sp.* y *Geotrichum fermentans*

El termino "poner en contacto una o mas células de levadura con un compuesto candidato" usado aquí incluye cualquier manera posible de llevar el compuesto candidato al interior de la célula que expresa la proteína de fusión. De esta manera, si el compuesto candidato tiene un peso molecular bajo, será suficiente añadir el compuesto en el medio de cultivo. En el caso que el compuesto tenga un peso molecular elevado (por ejemplo, un polímero biológico como un ácido nucleico o una proteína), será necesario proveer algún medio para que la molécula entre en el interior de la célula. Si es un ácido nucleico, una transfección convencional podría ser usada, tal y como se ha descrito anteriormente para la introducción de un polinucleótido. Si el compuesto es un polipéptido, la célula puede ser puesta en contacto con la proteína directamente o con un ácido nucleico que la codifique acoplado a elementos que ayuden a su transcripción/traducción una vez este en el interior celular. Con este propósito, cualquiera de los métodos mencionados anteriormente pueden ser usados para permitir su entrada en el interior celular. Alternativamente, es posible poner en contacto la célula con la variante de la proteína diana que ha sido modificada con un péptido que pueda promover su translocación al interior celular, como el péptido Tat derivado de la proteína HIV-1 TAT, la tercera hélice de la proteína Antennapedia homeodomain de *D.melanogaster*, la proteína VP22

20
25
30

del virus del herpes y oligómeros de arginina. (Lindgren, A. et al., 2000, *Trends Pharmacol. Sci.*, 21:99-103, Schwarze, S.R. et al., 2000, *Trends Pharmacol. Sci.*, 21:45-48, Lundberg, M et al., 2003, *Mol. Therapy* 8:143-150 and Snyder, E.L. and Dowdy, S.F., 2004, *Pharm. Res.* 21:389-393).

5

El compuesto bajo estudio no esta preferiblemente aislado sino que forma parte de una mas o menos compleja mezcla derivada de una fuente natural o forma parte de una librería de compuestos. Ejemplos de librerías de compuestos que puedan ser usados de acuerdo a la presente invención incluyen, pero no están limitados, a librerías de péptidos incluyendo péptidos y péptidos análogos comprendiendo los aminoácidos D o péptidos con enlaces no peptídicos, librerías de ácidos nucleicos incluyendo ácidos nucleicos con enlaces no-fosfodiester fosfotriatos o ácidos nucleicos peptídicos, librerías de anticuerpos, o carbohidratos, o compuestos con bajo peso molecular, preferiblemente moléculas orgánicas, o péptidos miméticos y parecidos. En el caso que se use una librería de compuestos orgánicos de bajo peso, la librería puede ser preseleccionada de manera que contenga compuestos que puedan acceder más fácilmente al interior celular. Estos compuestos pueden así ser seleccionados basándose en ciertos parámetros como tamaño, lipofilidad, hidrofilidad, capacidad para formar enlaces de hidrogeno.

20 Los compuestos que se usan en este ensayo pueden alternativamente formar parte de un extracto obtenido de una fuente natural. La fuente natural puede ser animal, de una planta obtenida de cualquier ambiente, incluyendo pero no limitado a extractos de organismos terrestres, marinos, aéreos o similar.

25 El termino "proteína de fusión" o "proteína quimérica" usado aquí comprende un polipéptido de la invención operativamente unido a otro polipéptido. Dentro de la proteína de fusión, el término "operativamente unido" se usa para indicar que el polipéptido acorde con la invención y otro polipéptido están fusionados en fase el uno al otro.

30

El termino "viabilidad celular" que se ha usado se refiere a la habilidad de las células en cultivo para sobrevivir dadas ciertas condiciones de cultivo o variables experimentales.

Tal y como se usa aquí, un “compuesto que afecta adversamente la viabilidad celular de la levadura o un compuesto tóxicotóxico” es cualquier compuesto cuya presencia en la célula huésped previene la célula huésped en cultivo de conseguir el crecimiento
5 logarítmico normal que pudiera haber conseguido sin la presencia del compuesto.

La enzima que afecta la viabilidad celular de la levadura es la dihidrofolato reductasa humana (h-DHFR) y el compuesto tóxico es el metotrexato (MTX)

10 En una realización preferida, el método se lleva a cabo usando un compuesto tóxicotóxico que esta marcado fluorescentemente. El grupo de compuestos fluorescentes que se puede usar para marcar el compuesto tóxico comprende, sin limitación alguna, FAM™, TET™, JOE™, VIC™, SYBR(R) Green; 6 FAM, HEX, TET, TAMRA, JOE, ROX, Fluoresceína, Cy3, Cy5, Cy55, Texas Red, Rodamina, Rhodamine Green,
15 Rhodamine Red, 6-CarboxyRhodamine 6G, Oregon Green 488, Alexa Flour, Oregon Green 500 or Oregon Green 514. El compuesto marcado fluorescentemente es el MTX y en particular, el fMTX.

En estos casos donde el método se lleva a cabo usando un compuesto tóxico marcado
20 fluorescentemente, el método consta de la detección de la fluorescencia de la célula de levadura donde un incremento en la fluorescencia intracelular es indicativo que el compuesto es capaz de disminuir la agregación del péptido con tendencia a agregar. Algunos métodos que permiten detectar la fluorescencia de la célula de levadura son, sin limitaciones algunas, FACS, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica y similares.

25

En otra realización preferida, el método se lleva a cabo usando cepas de levaduras con una permeabilidad elevada en la membrana. Cepas que tengan una permeabilidad elevada son ampliamente conocidas por una persona cualificada y pueden ser identificadas usando una tecnología estándar. En una realización preferida, la cepa de levadura tiene
30 una mutación inactivante en el gen *erg6*.

En otra realización preferida, el método de invención se lleva a cabo en una célula que tiene una mutación inactivante en una o más chaperonas. El término usado aquí de

“chaperonas moleculares” se refiere a un grupo de proteínas que están involucradas en el correcto plegamiento intracelular de polipéptidos sin ser componentes de las estructuras finales. En este contexto, chaperonas y chaperonas moleculares son intercambiables y equivalentes.

5

En una realización preferida, la chaperona molecular es seleccionada del grupo de miembros de la familia Hsp100, de miembros de la familia Hsp90, de miembros de la familia Hsp70, de miembros de la familia Hsp40 o de la familia “pequeñas proteínas de choque térmico”. De forma todavía mas preferente, el miembro de la familia Hsp100 es la proteína Hsp104, el miembro de la proteína Hsp90 es seleccionado del grupo de Hsc82 y Hsp82, el miembro de la familia Hsp70 es seleccionado del grupo de Ssa1, Ssa2, Ssa3 y Ssa4, el miembro de la familia Hsp40 es seleccionado del grupo de Ydj1 y Sis1 y/o el miembro de “pequeñas proteínas de choque térmico” es seleccionado del grupo de Hsp26 y Hsp42.

15

La invención también se relaciona con polipéptidos que comprenden polipéptidos con tendencia a la agregación y polipéptidos con una actividad enzimática donde se define “péptido con actividad enzimática” como el que es capaz de modificar un compuesto que afecta adversamente la viabilidad celular de la levadura transformándolo en un metabolito con reducida actividad adversa sobre la viabilidad celular.

20

Péptidos con tendencia a la agregación y polipéptidos que tengan una actividad enzimática que se puedan usar se han descrito detalladamente con anterioridad en relación al método de la invención. En una realización preferida, el polipéptido de la invención contiene un polipéptido marcador. El termino usado aquí como “polipéptido marcador” se refiere a un producto genético polipeptídico, el cual puede ser cuantificado directa o indirectamente. Genes marcadores que se puedan utilizar incluyen, sin limitación alguna, beta-galactosidasa (lacZ), beta-glucuronidasa (GUS), luciferasa, fosfatasa alcalina, sintasa nopalina (NOS), cloramfenicol acetil transferasa (CAT), peroxidasa de rábano (HRP). Como se usa en este contexto el término “proteína fluorescente” se refiere a una proteína que tiene fluorescencia intrínseca cuando se excita con radiación electromagnética en la adecuada longitud de onda. Las proteínas fluorescentes representativas pueden ser, pero no están limitadas, a las siguientes: sgGFP,

25
30

sgBFP, BFP *blue-shifted GFP* (Y66H), *Blue Fluorescent Protein*, CFP--*Cyan Fluorescent Protein*, Cyan GFP, DsRed, RFP monoméricas, EBFP, ECFP, EGFP, GFP (S65T), *GFP red shifted* (rsGFP), *GFP wild type, non-UV excitation* (wtGFP), *GFP wild type, UV excitation* (wtGFP), GFPuv, HcRed, rsGFP, *Sapphire GFP*, sgBFP.TM.,
 5 sgBFP.TM. (*super glow BFP*), sgGFP.TM., sgGFP.TM. (*super glow GFP*), wt GFP, *Yellow GFP* e YFP. De forma preferente, la proteína fluorescente es la GFP.

Por otro lado, la invención relaciona a un polinucleótido que codifica un polipéptido de la invención.

10

El término "polinucleótido(s)," como se usa aquí, significa un polímero monocatenario o bicatenario de bases de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos e incluye ADN y las correspondientes moléculas de ARN, incluyendo moléculas de ARNhn y ARNm, tanto cadenas sentido como anti-sentido, y comprende cADN, ADN genómico y ADN
 15 recombinante, así como polinucleótidos total o parcialmente sintetizados.

20

En otro aspecto, la invención se refiere al vector que comprende el polinucleótido de la invención. Un "vector", como se usa aquí, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar a otro ácido nucleico al que ha sido unido. El término "vector de
 20 expresión de levadura" como se usa aquí, se refiere a construcciones de expresión de ADN, por ejemplo, segmentos de ácido nucleico, plásmidos, cósmidos, fagos, virus o partículas de virus capaces de sintetizar las proteínas sujeto codificadas por sus respectivos genes recombinantes (transportados por el vector en levadura). Por otra parte, segmentos de ácido nucleico también pueden ser utilizados para crear células de levadura
 25 transgénicas, utilizando recombinación no-direccional u homóloga, en la que el gen o genes de interés son integrados en el genoma de levadura de forma estable.

30

Los polinucleótidos de la invención o los constructos de genes que los forman pueden formar parte de un vector. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un vector que comprende un polinucleótido o a una construcción génica de la invención. Un experto en la materia entenderá que no hay ninguna limitación en cuanto al tipo de vector que puede ser utilizado porque dicho vector puede ser un vector de clonación propicio para la propagación y para la obtención de polinucleótidos o construcciones de genes

adecuadas o vectores de expresión en diferentes organismos heterólogos apropiados para la purificación de los conjugados. Por lo tanto, vectores apropiados de acuerdo con la presente invención incluyen vectores de expresión en procariontes como pUC18, pUC19, Bluescript y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, CoIE1, pCR1, RP4, fagos y
5 vectores lanzadera como pSA3 y pAT28, vectores de expresión en levadura como vectores del tipo de plásmidos de 2 micrones, plásmidos de integración, vectores YEP, plásmidos centroméricos y similares, vectores de expresión en células de insecto como las series de vectores pAC y pVL, vectores de expresión en plantas tales como las series de vectores pIBI, pEarleyGate, pAVA, pCAMBIA, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, pORE
10 y similares y vectores de expresión en células de eucariotas superiores basados en vectores virales (adenovirus, virus asociados tanto a adenovirus como a retrovirus y lentivirus) así como vectores no virales tales como pSilencer 4.1-CMV (Ambion), pcDNA3, pcDNA3.1/hyg pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, pZeoSV2, pCI, pSVL and
15 pKSV-10, pBPV-1, pML2d i pTDTI.

Vectores para su uso con la invención son, por ejemplo, los vectores capaces de replicación autónoma y/o de expresión de ácidos nucleicos a los que están unidos en
20 células de levadura. En la presente especificación, los términos "plásmido" y "vector" se utilizan indistintamente como el plásmido es la forma más usual de un vector. Además, la invención tiene por objeto la inclusión otras formas de vectores de expresión que cumplan funciones equivalentes y que se conozcan en la materia posteriormente a esto. Dichos vectores de expresión de levadura pueden ser un vector de expresión de levadura
25 episomal o un vector de expresión de levadura de integración, y pueden ser obtenidos por técnicas convencionales conocidas por un experto en la materia.

De este modo, en una realización, dicho vector de expresión de levadura es un vector de expresión de levadura episomal. El término "vector de expresión de levadura episomal"
30 como se usa aquí, se refiere a un vector de expresión que se mantiene como una molécula de ADN extra-cromosómico en el citoplasma de la levadura. En una realización particular, dicho vector de expresión de levadura episomal, además de la secuencia

nucleotídica que codifica para la proteína FT o un fragmento de la misma que tiene actividad procoagulante unida operativamente a un promotor funcional de levadura, comprende a más a más: (i) un gen de selección de levadura; (ii) un origen de replicación de levadura, (iii) un gen de selección de bacterias, y (iv) una señal de terminación de la transcripción de levadura. Ventajosamente, dicho vector de expresión de levadura episomal comprende además un único sitio de restricción mayor que el Ue para clonar el gen seleccionado (proteína FT o un fragmento de la misma con actividad pro-coagulante) bajo el control del promotor funcional de levadura y seguido de la señal de terminación de la transcripción de levadura.

10

Prácticamente cualquier promotor funcional de la levadura, gen de selección de levadura, origen de replicación de levadura, gen de selección bacteriano, señal de terminación de la transcripción de levadura, y sitio de restricción para el clonaje, puede ser utilizado en la fabricación de dicho vector de expresión de levadura episomal; no obstante, en una realización particular, el promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (pGPD) se utiliza como promotor funcional de levadura; en otra realización particular, el gen URA3 es utilizado como gen de selección de levadura; en otra realización particular, el origen de replicación 2 micrones (2mu) de levadura se utiliza como el origen de replicación de levadura; en otra realización particular, el gen de resistencia a ampicilina Amp se utiliza como el gen de selección bacteriana, y en otra realización particular, la señal de terminación de la transcripción de la fosfoglicerato quinasa (PGKt) se utiliza como señal específica de terminación de la transcripción. Así, en una realización concreta (Ejemplos 1-3), el vector de expresión de levadura episomal comprende (i) el gen URA3, (ii) el gen Amp para la selección y la propagación del vector en E.coli, (iii) el origen de replicación de levadura 2mu, (iv) la pGPIX, (v) la señal específica de terminación de la transcripción PGKt y (vi) un sitio de restricción único BamHI que permite el clonaje de los genes seleccionados bajo el control de la pGPD, y seguido por el secuencia PGKt.

25

En otra realización, dicho vector de expresión de levadura es un vector de expresión de levadura de integración. El término "vector de expresión de levadura de integración" como se usa aquí, se refiere a un vector que es capaz de integrarse en el genoma de levadura. En una realización particular, dicho vector de expresión de levadura de

30

integración comprende: (i) un gen de selección de bacteriano; y (ii) un casete de expresión insertado en un gen de selección de levadura, dicho casete de expresión además comprende un promotor funcional de levadura, una señal de terminación de la transcripción de levadura y un único sitio de restricción para el clonaje del gen
5 seleccionado (la proteína FT o un fragmento de la misma con actividad pro-coagulante).

Prácticamente cualquier gen de selección bacteriano, casete de expresión insertado en un gen de selección de levadura, promotor funcional de levadura, señal de terminación de la transcripción de levadura, y sitio único de restricción para el clonaje del gen
10 seleccionado, puede ser utilizado en la fabricación de dicho vector de expresión de levadura de integración; no obstante, en una realización particular, el gen de resistencia a ampicilina (Amp) es usado como el gen de selección bacteriana.

El vector de la invención puede ser utilizado para transformar, transfectar o infectar
15 células que pueden ser transformadas, transfectadas o infectadas por dicho vector. Dichas células pueden ser procariotas o eucariotas. A modo de ejemplo, el vector en el que dicha secuencia de ADN se introduce puede ser un plásmido o un vector que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de dicha célula y se replica junto con el cromosoma (o cromosomas) en los cuales se ha integrado. Dicho vector
20 puede ser obtenido por métodos convencionales conocidos por expertos en la materia (Sambrok et al., 2001, mencionado anteriormente). Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una célula que comprende un polinucleótido, una construcción génica o un vector de la invención, para el que dicha célula ha sido capaz de ser transformada, transfectada o infectada con una construcción o vector proporcionados por
25 esta invención. Las células transformadas, transfectadas o infectadas pueden obtenerse por métodos convencionales conocidos por expertos en la materia (Sambrok et al., 2001, mencionado anteriormente). En una aplicación particular, dicha célula huésped es una célula animal transfectada o infectada con un vector adecuado.

30 Las células huésped adecuadas para la expresión de los conjugados de la invención incluyen, sin limitarse a, células de mamíferos, plantas, insectos, hongos y bacterias. Las células bacterianas incluyen, sin limitarse a, células de bacterias Gram-positivas, tales

como especies de *Bacillus*, géneros *Streptomyces* y *Staphylococcus* y células de bacterias Gram-negativas, tales como las células de los géneros *Escherichia* y *Pseudomonas*. Las células de hongos incluyen preferentemente células de las levaduras como *Saccharomyces*, *Pichia pastoris* y *Hansenula Polymorpha*. Las células de insecto incluyen, sin limitarse a, las células de *Drosophila* y *Sf9*. Las células vegetales incluyen, entre otros, células de las plantas cultivadas, como los cereales o las plantas medicinales, ornamentales o bulbosas. Las células de mamíferos adecuadas en la presente invención incluyen líneas de células epiteliales (porcinas, etc), líneas celulares de osteosarcoma (humanas, etc), líneas celulares de neuroblastoma (humanos, etc), carcinomas epiteliales (humanos, etc), las células gliales (murinas, etc), las líneas celulares hepáticas (de mono, etc), células CHO (ovario de hámster chino), células COS, células BHK, células HeLa, 911, AT1080, A549, 293 o PER.C6, células humana de ECC NTERA-2, células D3 de la línea mESC, células madre embrionarias humanas, tales como HS293 y BGV01, SHEF1, SHEF2 y células HS181, NIH3T3, 293T, células REH y MCF-7 y HMSC.

15

Las células huésped adecuadas incluyen las que muestran permeabilidad de membrana potenciada, así como las que tienen una mutación inactivadora en una o más chaperonas moleculares y han sido descritas en detalle anteriormente en relación con el método de la invención.

20

En otro aspecto, la invención se refiere a la utilización de una célula huésped de acuerdo con la invención para la identificación de compuestos que son capaces de inhibir la agregación de un polipéptido propenso a la agregación.

25 En otras realizaciones, la invención se refiere a:

[1] Un método para la identificación de compuestos que sean capaces de disminuir la agregación de un polipéptido con tendencia a agregar que comprenda:

(i) Poniendo en contacto una o mas células de levadura con un compuesto candidato. Estas células expresan una proteína de fusión que contiene la proteína de interés y el enzima DHFR. El enzima es capaz de cambiar un

compuesto que afecta de manera adversa el crecimiento celular, convirtiéndolo en un metabolito con una actividad nociva reducida.

(ii) Añadir el compuesto tóxico a la levadura en un solo paso (i) en una concentración en la cual, sin la actividad del enzima que forma parte de la proteína de fusión usada en el paso (i) la viabilidad celular se vera afectada adversamente.

(iii) determinación de la viabilidad celular de levadura donde, un incremento en la viabilidad celular de las células que han crecido con el compuesto en comparación con células que no han sido expuestas al compuesto candidato en cuestión indicara que el compuesto es capaz de disminuir la agregación de la proteína de interés.

[2] Método, de acuerdo con [1] en el que el polipéptido propenso a la agregación es un péptido amiloidogénico.

[3] Método, de acuerdo con [2] en el que el péptido amiloidogénico es A β 42.

[4] Método, de acuerdo con [2] en el que el péptido amiloidogénico son expansiones PoliQ.

[5] El método de acuerdo con [2] en el que el péptido amiloidogénico es una variante de α -sinucleína.

[6] Método, de acuerdo con [1] a [5] en donde la enzima es dehidrofolato reductasa humana (h-DHFR) y el compuesto tóxico es el metotrexato (MTX).

[7] El método, de acuerdo con cualquiera de [1] a [6], en donde la célula de levadura es seleccionada del grupo que consiste en *Saccharomyces uvae*, *Saccharomyces kluyveri*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces uvarum*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia kluyveri*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida sp.*, *Candida utilis*, *Candida cacaoui*, *Geotrichum sp.* i *Geotrichum fermentans*.

[8] Método, de acuerdo con cualquiera de [1] a [6] en donde la célula de levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.

5 [9] Método según cualquiera de [1] a [8] en donde la agregación del péptido amiloidogénico resulte en una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en la enfermedad de Alzheimer (AD), la enfermedad de Parkinson, la Polineuropatía Familiar Amiloide, una Tauopatía, la enfermedad de Trinucleótidos, las encefalopatías espongiiformes transmisibles (EET), y la enfermedad de Huntington (HD).

10

[10] Kit útil para la detección de compuestos que inhiben la agregación de proteínas, caracterizado por utilizar el método de acuerdo con [1].

EJEMPLOS

15

En esta invención usamos diferentes cepas de levadura en función de la prueba a realizar. La cepa FY834 se utilizó en los ensayos preliminares y en el estudio relacionado con la sobreexpresión de las chaperonas mientras que las pruebas con fármacos se realizaron en la cepa permeable a fármacos *erg6Δ* sobre una base parental BY4741. Cepas con una

20 deleción de una chaperona específica fueron proporcionadas por Euroscarf y se basaban también en la cepa BY4741. El metotrexato (MTX), la sulfanilamida, la quercetina y el Rojo Congo fueron adquiridos de Sigma Aldrich.

Todos los polipéptidos (A β 42, expansiones poliQ y α -sinucleína, así como sus variantes)

25 se fusionaron a la DHFR con la secuencia enlace GSAGSAAGSG (SEQ ID NO;1). La tabla 4.1 resume las fusiones de proteínas diseñadas para los experimentos. DHFR fue también clonada en el mismo plásmido (Figura 1).

Tabla 4.1 Diseño de las proteínas de fusión

proteínas diana	proteínas fusionadas	Plásmido	Sitios de restricción	Selección
A β 42	DHFR	pESC	<i>ClaI</i> , <i>BglII</i>	Ura/Trp
	GFP	pESC	<i>ClaI</i> , <i>BglII</i>	Trp
A β 42 F19D	DHFR	pESC	<i>ClaI</i> , <i>BglII</i>	Ura/Trp
	GFP	pESC	<i>ClaI</i> , <i>BglII</i>	Trp
Q25	DHFR	pESC	<i>ClaI</i> , <i>BglII</i>	Ura/Trp
	GFP	p416	<i>SalI</i> , <i>BamHI</i>	Ura
Q72	DHFR	pESC	<i>ClaI</i> , <i>BglII</i>	Ura/Trp
	GFP	p416	<i>SalI</i> , <i>BamHI</i>	Ura
Q103	DHFR	pESC	<i>ClaI</i> , <i>BglII</i>	Ura/Trp
	GFP	p416	<i>SalI</i> , <i>BamHI</i>	Ura
α -syn wt	DHFR	pESC	<i>ClaI</i> , <i>BglII</i>	Ura/Trp
	GFP	p426	<i>SpeI</i> , <i>XhoI</i>	Ura
α -syn A30P	DHFR	pESC	<i>ClaI</i> , <i>BglII</i>	Ura/Trp
	GFP	p426	<i>SpeI</i> , <i>XhoI</i>	Ura
α -syn A53T	DHFR	pESC	<i>ClaI</i> , <i>BglII</i>	Ura/Trp
	GFP	p426	<i>SpeI</i> , <i>XhoI</i>	Ura

En la siguiente tabla se muestran los plásmidos que codifican para las diferentes chaperonas en levadura.

5

Tabla 4.2 Plásmidos que codifican para las chaperonas usadas en este estudio

Chaperona	Plásmido	Sitios de restricción	Selección
Ssa1	pRS425	<i>BamHI</i> , <i>HindIII</i>	Leu
Hsp104	p2HG	<i>BamHI</i>	His
Hsp82	pTGpd	<i>BamHI</i>	Trp
Sis1	pTV3	<i>BamHI</i>	Trp

10

Las células crecen durante 8 horas a 30°C en un medio selectivo completo (SC) que contiene rafinosa. Se inoculan a una OD₆₀₀ de 0.02 en un medio mínimo de galactosa

con la concentración apropiada de MTX (20-100 μM) y 1 mM desulfanilamida. El crecimiento se controló midiendo la OD_{600} usando un espectrofotómetro Cary 400Bio.

5 En los ensayos de identificación de compuestos químicos el protocolo fue el mismo siendo las células inoculadas en un medio mínimo de galactosa con 20 μM MTX, 1mM sulfanilamida y el compuesto estudiado: quercetina (30 μM) o CR (10 μM). En este caso, se llevó a cabo una incubación previa antes de añadir la galactosa para asegurar la presencia del compuesto en la celula cuando la proteína de fusión empiece a expresarse. De esta manera, antes de la inducción con galactosa, la quercetina o el Congo Red fueron
10 añadidos en la misma concentración que en el ensayo final durante 90 minutos. Después de este periodo de tiempo, las células fueron inoculadas en un medio con galactosa, MTX y sulfanilamida.

Se tiene que tener en cuenta que los mismos compuestos se disolvieron en
15 DMSO. Para controlar el efecto del DMSO en las células, una cantidad equivalente de solvente fue añadido en el control negativo. Al cabo de 30 horas después de la inducción, los cultivos fueron diluidos 1/100 y su OD_{600} fue medida. En todos los experimentos, el valor de OD_{600} fue un triplicado de diferentes colonias.

20 Las células de levadura crecieron durante 8 horas en un medio mínimo con rafinosa. La densidad celular fue medida a través de la OD_{600} y las células se diluyeron hasta llegar a una OD_{600} de 0.18 usando PBS. Después, 10 μl de cada dilución (1/10, 1/10 and 1/100) se absorbió en placas de petri de medio selectivo con galactosa, MTX (20 μM) y sulfanilamida (1 mM). Las placas de petri fueron incubadas durante 48 horas a
25 30°C. Las imágenes se tomaron con el sistema Gel Doc XR de Bio-Rad.

Las células de levadura se transformaron con plásmidos codificando las proteínas de interés fusionadas con la DHFR y crecieron durante 8 horas en medio mínimo a 30°C con rafinosa. Las células crecieron durante 24 horas y después se incubaron con
30 sulfanilamida (1mM) y 10 μM de MTX marcado con la molécula fluorescente Alexa (Invitrogen) durante un periodo de 24 horas. Después el medio se cambió y las células fueron lavadas con PBS y reincubadas otra vez durante 30 min con medio selectivo para permitir la eliminación celular de fMTX que no se ha unido a DHFR. Después las células

fueron centrifugadas (1300xg durante 5 min) y lavadas con Tris-HCl 50mM pH=7 cinco veces. Las células fueron estudiadas por microscopía.

El principal componente de las lesiones de Alzheimer es el péptido hidrofóbico A β (1–42)²⁰. En estudios anteriores, nuestro grupo ha demostrado que la mutación de la fenilalanina 19 a aspartato (F19D) elimina la amiloidogenicidad del péptido A β 42 *in vitro*²¹ e inhibe la tendencia agregacional de A β 42 en *E.coli*²². Estos dos comportamientos opuestos de los péptidos A β 42 y su mutante F19D los convierten en unos prometedores candidatos para explorar los factores que influyen la agregación proteica en eucariotas, particularmente en levadura.

10

Para estudiar el comportamiento agregacional de las proteínas en un medio eucariótico, las dos variantes fueron expresadas en *S. Cerevisiae* como proteínas de fusión a la GFP. Mientras que la fusión A β 42(F19D)-GFP no agregó y su fluorescencia estaba distribuida uniformemente en la célula, la proteína A β 42-GFP estaba concentrada en un solo agregado grande al lado del núcleo celular, tal y como se demuestra con la tinción con Hoechst (Figura 2). El western blot de la fracción citoplasmática indica que las dos proteínas se expresan en niveles similares demostrando que el grado de coalescencia exhibido por la A β 42 depende mas de su secuencia que del nivel de proteína expresado.

20

La letalidad del MTX en las células FY384 de *S.cerevisiae* por encima de ciertas concentraciones (como 25 μ M con 1 mM de sulfanilamida) se puede anular con la transformación de un plásmido que codifica por la DHFR humana (h-DHFR) bajo el control del promotor Gal10. Diferentes grados de sensibilidad al MTX se pueden correlacionar con la actividad intracelular de la enzima expresada heterológamente, la cual variara dependiendo de su expresión como proteína sola, como fusión a moléculas solubles o como fusión a un péptido con tendencia agregacional. En el caso anterior, la proteína fusionada promoverá, al menos parcialmente, su deposición disminuyendo la actividad intracelular de la DHFR causando una mayor sensibilidad al MTX. Ya que las tendencias de agregación intrínsecas de los péptidos A β 42 y A β 42(F19D) determinan el destino de la GFP fusionada a ellos en levadura, los dos péptidos se fusionaron a la h-DHFR. La

30

diferente capacidad para crecer de las células expresando estas fusiones fue comparada con las células expresando la h-DHFR sola.

En la presencia de MTX, el crecimiento de levadura expresando la A β 42-DHFR se convirtió en estacionaria en un corto periodo de tiempo; mientras que las células expresando h-DHFR o el péptido A β 42(F19D)-DHFR mostraron un crecimiento mayor y con una velocidad similar (Figura 4). En ausencia de MTX, no se pudieron detectar diferencias en las curvas de crecimiento indicando que la divergencia en crecimiento no se podía relacionar con una diferente toxicidad de las proteínas expresadas.

Para confirmar que las diferencias detectadas en la viabilidad celular eran causadas por la diferente solubilidad de la h-DHFR debido a su fusión con las variantes de A β 42 se realizó un *filter trap assay*. Los resultados obtenidos son equivalentes a los obtenidos con GFP: agregados proteicos solo fueron detectados en el caso de levaduras expresando A β 42 DHFR mientras que A β 42(F19D)-DHFR o DHFR sola no formaron ningún agregado celular.

El sistema también podría utilizarse para controlar la influencia de las condiciones de cultivo sobre la agregación proteica. Está asumido que elevadas temperaturas fomentan la agregación proteica *in vivo* e *in vitro* ya que refuerzan las interacciones hidrofóbicas entre los polipéptidos. Incrementando la temperatura de cultivo de 30°C a 37°C se detecta una disminución en la viabilidad de las células expresando A β 42-DHFR en todas las concentraciones de MTX, además de las células que expresan A β 42(F19D)-DHFR a elevadas concentraciones de MTX (Figura 3). Este efecto fenotípico no se observó en las células expresando h-DHFR sola. Este resultado nos sugiere que la temperatura específicamente aumenta, directa o indirectamente, la propensión a agregar del péptido A β y que el sistema es suficientemente sensible para detectar este efecto.

En conclusión, estos resultados indican que la actividad h-DHFR, reflejada en el crecimiento celular, puede ser usada como marcador para monitorizar la influencia de factores extrínsecos e intrínsecos en la agregación de un determinado péptido.

La fiabilidad de los métodos indirectos para estudiar la agregación *in vivo* siempre tiene que ser confirmada midiendo la solubilidad de una proteína diana usando otro método. En nuestro caso, una estrategia fue la fusión del mismo péptido a la proteína GFP. Después, esta fusión fue expresada en el mismo ambiente eucariótico y el estado
5 agregacional de la proteína de interés fue detectada a través de la localización de la fluorescencia. Alternativamente, la solubilidad de la proteína de interés fusionada a la DHFR fue detectada por *filter trap assay* o ensayo de retención en filtro.

En este contexto, quisimos explotar la habilidad de h-DHFR para unir MTX con
10 una gran afinidad en un complejo 1:1 para visualizar la presencia de la enzima activa en las células. Con este propósito, usamos una versión del inhibidor marcado fluorescentemente (fMTX). Ha sido demostrado con anterioridad que fMTX se retiene en las células a través de su unión a DHFR, mientras que el fMTX que no se ha unido se transporta al exterior celular. Además, la interacción del fMTX y la DHFR resulta en un
15 incremento de 4.5 en la emisión de fluorescencia. De esta manera, el fMXT unido, y por inferencia la DHFR bien plegada, puede ser visualizado por microscopia.

Los resultados obtenidos a través de la visualización del fMTX en células expresando h-DHFR, A β 42-DHFR y A β 42(F19D)-DHFR coincidieron con los obtenidos
20 en las fusiones a GFP.

Mientras que las células que expresan h-DHFR y A β 42(F19D)-DHFR no tenían agregados y su fluorescencia era elevada y estaba distribuida por toda la célula, la fluorescencia de las que expresaban A β 42-DHFR era baja, indicando una cantidad menor
25 de enzima bien plegado y estaba concentrado en un solo agregado por célula. Se podría deducir que la secuencia de la proteína diana determina el estado de agregación del enzima. Además, la solubilidad de la proteína diana pudo ser fácil y simultáneamente monitorizada midiendo la viabilidad celular en presencia de MTX así como visualizando la localización del inhibidor fluorescente en la célula.

30

Para probar la aplicación general del método, otras proteínas con tendencia a agregar fueron fusionadas a la DHFR verificando la relación entre la agregación proteica

y la supervivencia de la levadura. Con este propósito, repeticiones de poliglutamina y la proteína α -sinucleína fueron escogidas debido a su elevada tendencia a agregar y su implicación en patologías humanas: el Huntington y el Parkinson, respectivamente.

5 En el caso de las repeticiones de glutamina, se ha demostrado con anterioridad que su tendencia a agregar depende de su longitud. Tal y como se hizo en el caso anterior, la distribución de las diferentes variedades en células de levadura fue estudiado a través de su fusión con la GFP. Mientras que las células expresando repeticiones de 25 poliglutaminas (Q25) tienen la fluorescencia en toda la célula, levaduras expresando 72
10 (Q72) o 103 (Q103) exhiben varios focos fluorescentes. Además, el número y tamaño de puntos aumenta con la longitud de las repeticiones de glutamina (Figura 7).

 En la ausencia de MTX, la fusión de los fragmentos poliQ a la DHFR reduce la viabilidad celular. No obstante, todas las repeticiones muestran un efecto similar a la
15 viabilidad celular independientemente de su longitud.

 En presencia de MTX, el crecimiento de la levadura es inversamente proporcional a la longitud de las repeticiones de poliQ. En otras palabras, levaduras expresando Q25-DHFR tienen el máximo crecimiento. Por lo tanto, la supervivencia de las células
20 expresando las diferentes poliQ fusionadas a la DHFR se correlaciona con la solubilidad observada en las fusiones a GFP. Esta relación indica que, en las condiciones del ensayo, la presencia de DHFR correctamente plegada determina el crecimiento celular.

 El uso de fMTX proporcionó resultados que coincidieron con estos datos. En
25 células expresando Q25-DHFR, la enzima fue soluble porque la fluorescencia era elevada y distribuida homogéneamente en la célula. Por el contrario, bajo la presencia de Q72 o Q103, la emisión de fluorescencia y la enzima activa se localizan mayoritariamente en los agregados (Figura 8).

30 La α proteína α -sinucleína (α -Sin) forma la parte fibrosa de los Cuerpos de Lewy, inclusiones citoplasmáticas presentes en la enfermedad del Parkinson (PD). Dos formas raras de PD están relacionadas con mutaciones en el gen α -Sin: A53T y A30P. Las dos variantes tienen diferentes propiedades físicas: A53T se acumula en la membrana

citoplasmática o en focos citoplasmáticos como la proteína salvaje α -Sin; mientras que A30P se dispersa por toda la célula.

5 Cuando todas las variantes de la α -Sin fueron fusionadas a la GFP, los fenotipos descritos anteriormente se repitieron (Figura 9). Cuando las variantes fueron fusionadas a la DHFR y expresadas en levadura en ausencia de MTX, la viabilidad celular se redujo en un grado similar indicando una cierta toxicidad inherente al gen α -Sin cuando se expresa en levadura.

10 En presencia de MTX, la expresión de α -SinA30P-DHFR permite a la célula crecer a una velocidad bastante próxima a las células que expresan h-DHFR sola, mientras que α -SinA53T-DHFR o α -Sin-DHFR presentan una viabilidad reducida significativamente.

15 En general, la supervivencia de la levadura expresando las variedades de α -Sin fusionadas a DHFR se correlaciona con la solubilidad observada en las fusiones con GFP. Este hecho demuestra otra vez que la presencia de DHFR correctamente plegada controla el crecimiento celular en las condiciones del ensayo (Figura 10)

20 En concordancia con todos estos resultados, la fluorescencia de las células expresando SinA30P-DHFR fue más elevada y no se observaron agregados. Por otro lado, focos normalmente en la membrana citoplasmática fueron observados en los casos del salvaje y el mutante A53T.

25 La identificación de pequeños compuestos químicos que afecten el tamaño o el número de los agregados proteicos en las células es una de las aproximaciones hacia la intervención terapéutica contra las enfermedades amiloidogénicas. Quisimos explorar si el método anteriormente explicado podría ser útil para identificar estos compuestos. Como caso de estudio, la cepa *erg6* Δ expresando h-DHFR y A β 42-DHFR creció bajo la presencia de quercetina y Congo Red (CR), compuestos que se unen a agregados A β *in vitro*.

30

De esta manera, el ensayo pudo detectar la actividad inhibidora de la quercetina (numero CAS [117-39-5]) contra la agregación proteica. La presencia de este flavonoide en el medio restableció el crecimiento de células expresando el A β 42 salvaje y redujo el tamaño de los agregados A β intracelulares, sugiriendo que actúa sobre la agregación de A β 42 *in vivo*. Por el contrario, en las condiciones del experimento, el Congo Red (CR) (numero CAS [573-58-0]) no tuvo un efecto positivo en el crecimiento. En concordancia, recientemente se ha demostrado que, *in vitro*, CR inhibe la oligomerización de A β 42. Además, se ha probado que bajas concentraciones de CR pueden promover la formación de fibras cuestionando la utilidad terapéutica de este compuesto o sus análogos para inhibir la amiloidosis. El incremento en el número de focos de agregación promovidos por el CR en nuestro sistema puede reflejar un efecto similar en la agregación del A β dentro de la levadura explicando el observado negativo impacto en el crecimiento celular.

El análisis del efecto de la sobreexpresión o delección de chaperonas demostró la aplicación del método en el cribado genético. En general, el cambio en el nivel de chaperonas tiene un impacto muy grande en la supervivencia de las células y en el tamaño y distribución de los agregados A β intracelulares.

Entre todo el conjunto de chaperonas, la sobre-expresión del gen Sis1 (el homólogo en levadura del humano HDJ1) tuvo el efecto más dramático en la viabilidad. Este resultado no es sorprendente porque el *knockout* del gen *sis1* no es viable, siendo esencial en levadura. Este efecto es claramente mayor que el promovido por Ydj1 (el homólogo de Hsp40 en levadura). En concordancia, en células de mamífero y de levadura, las chaperonas Sis1/HDJ1 tienen un efecto más grande que Ydj1/HDJ2 en modular la agregación de poliQ.

La sobreexpresión de Hsp104 también aumenta la viabilidad celular. Hsp104 permite la recuperación de las proteínas desde su estado agregado recobrando su función. Se trata de una proteína clave en la red de las chaperonas. Extrañamente, Sis1 o especialmente Hsp104 promueven un incremento de la señal de fluorescencia en el citoplasma y en los agregados. Esto coincide con el efecto en el modelo de levadura HD,

donde se demostró que las proteínas presentes en los agregados se encuentran menos empaquetadas. Teniendo en cuenta la relación entre el empaquetamiento de los agregados de A β -GFP y la actividad de la proteína agregada que se observó en bacterias, estas chaperonas podrían promover una disminución del empaquetamiento dando lugar
5 probablemente a un aumento de la actividad de los agregados de A β -GFP.

Por el contrario, el aumento de la viabilidad dado por Hsp82 parece depender directamente de la disminución de la agregación de A β 42, resultado de la disminución de focos intracelulares. Curiosamente, homólogos humanos también interactúan con los amiloides precursores en AD dando lugar a una regulación al alza que protege las
10 neuronas de las formas tóxicas de A β .

Sorprendentemente, los *knockout* de las chaperonas Hsp35, Hsp26 y Hsp42 promueven el crecimiento celular, lo que implica una menor agregación de A β . Hsp35 es un miembro de la familia de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y se supone que es una chaperona ya que se ha encontrado que es inducible por calor y es muy
15 abundante en levadura. Curiosamente, en humanos, una variación polimórfica en los genes de GAPDH está asociado con un elevado riesgo de desarrollar AD y este efecto depende específicamente de la interacción con el péptido A β . Además, el homólogo de hsp35 en *Caenorhabditis elegans* está regulado a la baja en animales transgénicos que expresan A β 42.

Hsp26 y Hsp42 son proteínas pequeñas de choque térmico (sHsp), las cuales atrapan las proteínas mal plegadas que se encuentran dentro de los agregados las cuales han sido reactivadas por el sistema de chaperonas Hsp104/Hsp70/Hsp40. Sin embargo, la relación sustrato/sHsp da como resultado un mayor (y más ajustado) complejo, el cual está mal reactivado por otras chaperonas. El *knockout* de sHsp podría prevenir la
20 incorporación del A β 42 sobreexpresado dentro de los sHsp agregados reduciendo indirectamente su deposición.

Se ha demostrado que la pérdida de función de Ydj1 reduce la agregación de poliQ, una observación compatible con el incremento de la supervivencia de las levaduras promovida por este *knockout* en nuestro modelo.

Por otro lado, la delección de miembros de la familia de Hsp70 citosólica (Ssa1, Ssa2 y especialmente Ssa4) reducen la viabilidad celular e incrementa el número de focos fluorescentes dentro de las células. Es importante destacar que, en un modelo
30

agregacional de poliQ en levadura, la mutación de los genes SSA1 y SSA2 también inhibió la expansión de pequeños focos agregados dentro de los cuerpos de inclusión. Por último, estos impactos enormes tanto en viabilidad como en agregación, sugieren que la supresión de Ssa4 podría jugar un papel importante en el plegamiento/disposición de las proteínas. En consecuencia, bajo estrés conformacional el número de ARNm de Ssa4 incrementa.

En general, y aunque el trabajo presentado no tuvo como objetivo caracterizar en detalle el efecto específico de cada chaperona en la agregación intracelular de A β 42, los datos obtenidos confirman que la agregación en levadura de los polipéptidos relacionados con enfermedades comparten características que sugieren una manera nueva y diferente de estudiar la agregación de A β .

La prevalencia de las enfermedades conformacionales en nuestra sociedad presenta un nuevo reto tanto para la investigación básica como aplicada. En los últimos años, la simple, pero potente, genética de *S. cerevisiae* ha sido explotada para el estudio de la agregación intracelular de las proteínas amiloides. En el presente estudio, parece que la enfermedad del Alzheimer podría ser otro trastorno el modelado en levadura del cual, podría contribuir a descifrar mecanismos de agregación amiloide conservados y/o diferentes y ayudar en la identificación de posibles dianas terapéuticas. La capacidad del método aquí discutido para relacionar la agregación proteica con la supervivencia nos proporciona una manera rápida, visual y fácil de detectar automáticamente posibles mutaciones, genes o compuestos que modulen la agregación de los polipéptidos relacionados con enfermedades dentro de células eucariotas. Además, este método debe tener una amplia aplicación en la producción y el diseño de proteínas, así como en los estudios de plegamiento.

La mutación *erg6* inhibe la biosíntesis del ergosterol, la cual aumenta la fluidez y la permeabilidad de la membrana a varios compuestos químicos. Esta mutación da como resultado un aumento de la sensibilidad a MTX, cuatro veces superior comparada con la cepa FY384 y en una disminución concomitante en la viabilidad de las *erg6 Δ células que expresan A β 42-DHFR en relación con las que expresan h-DHFR. Por lo tanto, para controlar específicamente los efectos de los compuestos sobre la viabilidad de las células que expresan la fusión A β 42, el crecimiento de referencia es siempre el de las células que expresan h-DHFR en las mismas condiciones. La quercetina es un*

compuesto flavonoide el cual inhibe la formación de fibras amiloides *in vitro* y reduce la toxicidad de los fragmentos de A β en células de neuroblastoma. En presencia de MTX, células que expresan el péptido A β 42-DHFR dan lugar a una restauración del crecimiento dependiente de la concentración de quercetina (Figura 11 A). Curiosamente, este efecto
5 también se observó en un modelo de levadura de α -sinucleopatía en concentraciones similares de quercetina.

Por otro lado, a pesar de que la función del CR como ligando de fibras amiloides está ampliamente estudiado, no observamos un efecto significativo a 10 μ M (Figura 11 A). Sorprendentemente, esta concentración de CR ha demostrado reducir
10 significativamente la agregación de la huntingtina con la poliglutamina (poliQ) dentro de células de mamífero.

Las diferencias observadas en la actividad de ambas sustancias en la agregación de A β 42 en levadura pueden ser explicada analizando las imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de células que expresan el péptido A β 42 fusionado con
15 GFP en medios que contienen determinadas concentraciones de quercetina o CR (Figura 11 B). En las células que han crecido en presencia de quercetina 30 μ M observamos la presencia de un único agregado por célula con un diámetro medio (0.6 μ m) menor que el formado en ausencia de este compuesto (0.1 μ m), sugiriendo que efectivamente tiene como diana las proteínas intracelulares insolubles *in vivo*. Las células tratadas con 10 μ M
20 CR presentan un gran foco fluorescente con un diámetro medio de 1.1 μ m, así como muchos otros más pequeños. Así que aunque el CR podría interferir en el proceso de agregación de A β 42 en levadura, no aumenta la concentración de proteína soluble y no promueve la aparición de nuevos focos de agregación.

Se ha demostrado que los cambios en los niveles de chaperonas en las células
25 modulan la agregación proteica en levaduras con modelos como las enfermedades de Huntington y Parkinson. Para evaluar si este método podría ser sensible a las diferencias en composición y concentración de proteínas implicadas en la maquinaria celular del plegamiento, se diseñaron un grupo de cepas con *knockouts* de chaperonas y otras con sobreexpresión, las cuales producían h-DHFR y A β 42-DHFR. En la tabla 4.3,
30 observamos una clasificación de todas las chaperonas utilizadas en esta sección de acuerdo con sus familias.

Tabla 4.3 Lista de las chaperonas estudiadas

Familia	Miembros
Hsp100	Hsp104
Hsp90	Hsc82, Hsp82
Hsp70	Ssa1, Ssa2, Ssa3, Ssa4
Hsp40	Ydj1, Sis1
Pequeñas proteínas de choque térmico	Hsp26, Hsp42

La sobreexpresión de las chaperonas estudiadas promueve un incremento en la viabilidad celular de las células que expresan A β 42-DHFR en medio líquido conteniendo
 5 MTX. Las chaperonas con un mayor efecto en orden decreciente fueron: Sis1, Hsp104, Hsp82 y Ssa1 con un impacto moderado en la supervivencia de la levadura Ydj1 (Figura 12 A). Sin embargo, en estudios paralelos de spotting en presencia de MTX solamente la sobreexpresión de Sis1 y Hsp82 promovieron un incremento claro de la supervivencia celular (Figura 12 B)

10 Análisis de western blot contra A β 42 demostraron la formación de oligómeros SDS-estables (Figura 12). Estos oligómeros recuerdan a los formados por el péptido A β 42 *in vitro*, en cultivo de células de mamíferos, y en el cerebro humano. Curiosamente, la expresión en levadura de A β 42 fusionado al dominio MRF del prión Sup35 da lugar a una distribución muy similar de oligómeros SDS-estables. En general, los niveles y la
 15 distribución de A β 42-DHFR no se vieron afectados por la sobreexpresión de chaperonas sugiriendo que las dianas son grandes agregados causando las diferencias observadas en la viabilidad.

En consecuencia, las imágenes de microscopía de fluorescencia de levaduras que expresan A β -GFP mostraron que las chaperonas afectaban fuertemente la distribución de
 20 la fluorescencia (Figura 12). Las células que sobreexpresaban Hsp104 aumentaban dramáticamente el número y la intensidad de las inclusiones fluorescentes, así como de la fluorescencia de fondo. Las células que sobreexpresaban Sis1 presentaban generalmente un gran agregado y varios núcleos menores de agregación con alta fluorescencia de fondo. Por otro lado, la sobreexpresión de Hsp82 y Ssa1 dio lugar a un fenotipo similar
 25 al descrito en presencia de quercetina, con sólo un pequeño foco fluorescente por célula. Y la sobreexpresión de Ydj causó la aparición de varios pequeños focos por célula (figura 13A)

Para probar si la reducción de chaperonas también afectaba la agregación intracelular de A β 42, las cepas con un *knockout* en un gen de una chaperona específica fueron transformadas con plásmidos que codificaban la h-DHFR o el péptido A β 42-DHFR y su crecimiento se midió en presencia de MTX. Sorprendentemente, la reducción de algunas chaperonas resultó en un incremento relativo del crecimiento celular respecto a la cepa salvaje (*hsp35 Δ* , *hsp42 Δ* y *hsp26 Δ*), mientras que otros resultaron en una disminución de la densidad celular (*ssa1 Δ* , *ssa2 Δ* , *hsc82 Δ* o *hsp104 Δ*) y una cepa no creció (*ssa4 Δ*) (figura 14).

10

El análisis por Western blot indicó que no existían diferencias significativas en la expresión global de A β 42-DHFR y en la que existía entre los *knockouts* pero algunas chaperonas afectaban la distribución de oligómeros. (figura 15B).

15 Para comprobar si la delección de chaperonas influía en la distribución intracelular de agregados del péptido A β 42, algunas cepas *knockout* fueron transformadas con este péptido fusionado a la GFP (Figura 15A). Las células *hsp35 Δ* exhibían un único foco fluorescente con un diámetro más pequeño (0,6 μ m) que las células con el genoma salvaje. Por otra parte, las delecciones de Ssa1, Ssa2 o Hsp 104 dieron lugar a la aparición de más de un agregado de A β 42-GFP por célula. Vale la pena hacer notar que la cepa *ssa4 Δ* , que ha perdido la capacidad de crecer en presencia de MTX a pesar de la sobreexpresión de h-DHFR, mostró un gran número de agregados de A β 42 indicando un aumento anómalo de la agregación de polipéptidos en ausencia de este gen.

25 Las siguientes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* fueron usadas:

Saccharomyces cerevisiae cepa FY834

Genotipo: *MAT a ura3-52 leu2-1 trp1-63 his3-200 lys2-202*

30 *Saccharomyces cerevisiae* cepa BY4741

Genotipo: *MAT a his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura 3 Δ 0*

Fueron cedidas por Euroscarf (European *Saccharomyces cerevisiae* Archive for Functional analysis)

Saccharomyces cerevisiae cepa *erg6*Δ

5 Genotipo: *MAT* a *his3*Δ1 *leu2*Δ0 *met15*Δ0 *ura3*Δ0 *erg6*Δ::*kanMX4*.

Esta cepa (basada en la parental BY4741) tiene una mutación que afecta la permeabilidad celular, específicamente en el gen que codifica la C-24 esterol metiltransferasa Erf6p.

10 Los siguientes vectores fueron usados:

Vectores pESC (Stratagene)

Los vectores pESC son una serie de vectores diseñados para la expresión y el análisis funcional de genes eucarióticos en la levadura *S. cerevisiae*. Estos vectores
15 contienen los promotores de levadura GAL1 and GAL10 y el origen 2μ, el cual permite la replicación autónoma de los plásmidos en la levadura. Tienen un gen (*HIS3*, *TRP1*, *LEU2*, or *URA3*) que permite seleccionar y mantener la expresión del vector en las células de levadura.

Los siguientes medios para *Saccharomyces cerevisiae* fueron usados:

20

Medio YDP (Yeast Extract Peptone Dextrose)

Disolver los siguientes compuestos en 800 ml H₂O:

- 10 g of Extracto de levadura
- 25 20 g of BactoPeptona
- 20 g Dextrosa

Ajustar el volumen a 1 litro con ddH₂O.

Esterilizar.

30 Medio SC (sintético completo)

Disolver los siguientes compuestos en 1 litro ddH₂O

- 6.7 g Base de nitrógeno para levadura sin aminoácidos
- 100 ml de la solución apropiada 10X Drop Out

Ajustar el pH a 5.8 si es necesario, y autoclavar. Añadir la fuente de carbono apropiada, normalmente dextrosa al 2%.

Solución Drop Out

- 5 Para preparar un litro de 10x –Leu/–Trp/–URA/–His solución Drop Out, combinar los compuestos de la tabla teniendo en cuenta el aminoácido que tiene que ser omitido del Drop Out. Por ejemplo, si el Drop Out es –Leu, no se tiene que añadir leucina a la solución final.

10 **Tabla M.1** Componentes de la solución Drop Out

Constituyente	Final mg/ml	solución para 100 ml dH ₂ O	ml stock for 1l medio
Adenina sulfato	20	200 mg*	10
Uracil	20	200 mg*	10
L-tryptofano	20	1 g	2
L-histidina- HCL	20	1 g	2
L-arginina- HCL	40	1 g	4
L-metionina	20	1 g	2
L-tirosina	50	200 mg	25
L-leucina	60	1 g	6
L-isoleucina	60	1 g	6
L-lisina-HCL	50	1 g	5
L-fenilalanina	50	1 g*	5
L-aspartico	100	1 mg	10
L-glutamico	100	1 g*	10
L-valina	150	3 g	5
L-treonina	200	4 g*	5
L-serina	400	8 g	5

Algunos stocks pueden guardarse a temperatura ambiente (marcados con un asterisco) para prevenir precipitación, mientras que otros tienen que estar refrigerados. Después la solución se esteriliza.

- 15 La preparación de células competentes de levadura será conocida por cualquier persona con conocimientos en el campo y puede ser, por ejemplo, siguiendo el protocolo descrito en Gietz, R.D. & Schiestl, R.H. *Frozen competent yeast cells that can be*

transformed with high efficiency using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. Nat Protoc 2, 1-4 (2007), método usado en la presente invención.

La transformación de células de levadura es conocida por cualquier persona experta en el
5 campo. Como ejemplo, tenemos el siguiente método:

- 1) Descongelar las células en un baño durante 15–30 s.
- 2) Centrifugar a 13000xg por 2 min y retirar el sobrenadante.
- 3) Preparar una mezcla para la transformación de levadura (FCC) de acorde con el
10 número de transformaciones deseadas más una extra. La alícuota extra será el control negativo sin ADN. Añadir esta mezcla al pellet y resuspender el pellet mezclando vigorosamente.

Tabla M.3 Componentes de la solución para transformar levadura (FCC)

Componentes de la mezcla de transformación	Volumen (ml)
PEG 3350 (50% (w/v))	260
LiAc	36
ADN portador (2mg/ml)	50
plásmido ADN	14
Volumen total	360

15

- 4) añadir 70 µl de DMSO. Mezclar vigorosamente.
 - 5) Incubar a 30°C durante 30 min con agitación (200 r.p.m).
 - 6) Incubar a 42°C durante 15 min.
 - 7) Incubar las células en hielo durante 1–2 min.
 - 8) Centrifugar los tubos a 13000xg durante 30 s y quitar el sobrenadante.
 - 9) Pipetear 1.0 ml de agua estéril dentro del tubo.
 - 10) Plaquear 200 µl de la suspensión celular en el medio SC apropiado de selección.
- Tener en cuenta que elevadas densidades celulares afectan negativamente a la eficiencia de transformación

25

- Incubar las placas a 30°C durante 3–4 días.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la identificación de compuestos que son capaces de disminuir la agregación de un polipéptido propenso a agregar que comprende:
 - 5 (i) poner en contacto una o más células de levadura con un compuesto candidato, donde las células de levadura expresan una proteína de fusión formada por el polipéptido con tendencia a agregar y la dihidrofolato reductasa humana (hDHFR) bajo condiciones en las cuales el polipéptido promueve en parte la deposición de hDHFR,
10 dando lugar a la pérdida de la actividad intracelular de hDHFR y un incremento de la sensibilidad de las células de levadura al MTX,
 - (ii) añadir MTX o un inhibidor específico de la DHFR a las células de levadura del paso (i) en una cantidad que, sin la presencia de la actividad de la enzima hDHFR, que forma parte de la proteína de fusión utilizada en el paso (i), puede afectar negativamente la
15 viabilidad de las células de levadura, y determinar la viabilidad de las células de levadura
donde un incremento de la viabilidad de las células respecto las células que no han sido expuestas al compuesto candidato indica que este compuesto es capaz de
20 disminuir la agregación del polipéptido con tendencia a agregar.
2. Un método, según la reivindicación 1, donde el polipéptido con tendencia a agregar es un péptido amiloidogénico.
- 25 3. Un método según la reivindicación 2, donde el péptido amiloidogénico es seleccionado del grupo de A β 42, un péptido que comprende una expansión de Poliglutaminas y una variante de α -sinucleína.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el compuesto
30 que afecta negativamente a la viabilidad celular de la levadura es el metotrexato (MTX).

5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el compuesto que afecta negativamente la viabilidad de las células de levadura está marcado con fluorescencia.
- 5 6. Un método según la reivindicación 5, donde el paso (iii) además comprende la detección de la fluorescencia de las células de levadura, donde un aumento de la fluorescencia intracelular es indicativo de que el compuesto es capaz de disminuir la agregación del polipéptido.
- 10 7. Un método, según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 6, donde las células de levadura son seleccionadas entre el grupo formado por *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvae*, *Saccharomyces kluyveri*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces uvarum*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia kluyveri*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida*
 15 *sp.*, *Candida utilis*, *Candida cacaoi*, *Geotrichum sp.* y *Geotrichum fermentans*
8. Método, según las reivindicaciones de la 1 a la 7, donde la membrana de la célula de levadura muestra un aumento de permeabilidad.
- 20 9. Método según la reivindicación 8, donde la cepa de la levadura tiene una mutación que inactiva el gen *erg6*.
10. Método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la célula de levadura lleva una mutación de inactivación en una o más de una chaperona
 25 molecular seleccionada entre los miembros de las siguientes familias: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp40 o de pequeñas proteínas de choque térmico.
11. Un método según la reivindicación 10 donde el miembro de la familia de proteínas Hsp100 es la Hsp104, el miembro de la familia Hsp90 es seleccionado del grupo
 30 Hsc82 y Hsp82, el miembro de la familia Hsp70 es seleccionado del grupo de Ssa1, Ssa2, Ssa3 y Ssa4, el miembro de la familia de Hsp40 es seleccionado del

grupo de Ydj1 y Sis1 y/o de las proteínas pequeñas de choque térmico se han seleccionado del grupo de Hsp26 y Hsp42.

- 5
12. Un polipéptido formado por un polipéptido con tendencia a agregar y un polipéptido con actividad enzimática donde el polipéptido con tendencia a agregar es un péptido amiloidogénico y el polipéptido con actividad enzimática es la DHFR y dicho polipéptido con actividad enzimática es capaz de modificar un compuesto, que afecta negativamente a la viabilidad celular de la levadura, a un metabolito de dicho compuesto con un efecto adverso reducido sobre dicha viabilidad celular.
- 10
13. Un polipéptido, según la reivindicación 12 donde el péptido amiloidogénico se ha seleccionado entre el grupo de A β 42, un polipéptido que comprende una repetición de poli-glutamina y α -sinucleína o una variante de la misma.
- 15
14. Un polipéptido como se define en las reivindicaciones 12 o 13 donde la DHFR es la DHFR humana.
15. Un polipéptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones de la 12 a la 14 formado por un polipéptido marcador.
- 20
16. Un polipéptido, según la reivindicación 15 donde el polipéptido marcador es una proteína fluorescente.
17. Un polipéptido, según la reivindicación 16 donde la proteína fluorescente es la GFP.
- 25
18. Un polinucleótido que codifica un polipéptido definido en cualquiera de las reivindicaciones de la 12 a la 17.
- 30
19. Un vector que comprende un polinucleótido según la reivindicación 18.

20. Una célula huésped que comprende un polipéptido definido en cualquiera de las reivindicaciones de la 12 a la 17, un polinucleótido definido en la reivindicación 18 o un vector definido en la 19.
- 5 21. Una célula huésped definida en la reivindicación 20, donde la célula huésped es una célula de levadura.
22. Una célula huésped, según la reivindicación 21, donde la célula de levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.
- 10 23. Una célula huésped como se define en cualquiera de las reivindicaciones entre la 20 a la 22, donde la célula de levadura muestra una mayor permeabilidad de la membrana.
- 15 24. Una célula huésped según la reivindicación 23, donde lleva una mutación que inactiva el gen *erg6*.
- 25 25. Una célula huésped según las reivindicaciones de la 21 a la 24, donde la célula lleva una mutación de inactivación de una o más de una chaperona molecular seleccionadas a partir de un miembro de la familia de las proteínas Hsp100, un miembro de la familia Hsp90, de la familia de las proteínas Hsp70, de la familia de las proteínas Hsp40 o una proteína pequeña de choque térmico.
26. Una célula huésped según la reivindicación 25, donde el miembro de la familia de proteínas Hsp100 es la Hsp104, el miembro de la familia Hsp90 es seleccionado del grupo Hsc82 y Hsp82, el miembro de la familia Hsp70 es seleccionado del grupo de Ssa1, Ssa2, Ssa3 y Ssa4, el miembro de la familia de Hsp40 es seleccionado del grupo de Ydj1 y Sis1 y/o las proteínas pequeñas de choque térmico se han seleccionado del grupo de Hsp26 y Hsp42.

30

27. Una célula huésped como se define en cualquiera de las reivindicaciones de la 21 a la 26, el uso de la cual permite identificar compuestos capaces de inhibir la agregación de los polipéptidos con tendencia a agregar.
- 5 28. Método de detección de un compuesto que disminuye la agregación de polipéptidos propensos a la agregación, donde el método comprende (a) el compuesto candidato se ponga en contacto con una o más células de levadura, donde las células de levadura expresen una proteína de fusión formada por un polipéptido con tendencia a agregar y la dihidrofolato reductasa humana (hDHFR) la cual inhibe la toxicidad del compuesto metotrexato (MTX), el cual afecta a la viabilidad de las células de levadura (b) la adición del compuesto tóxico para la célula de levadura en una cantidad que, sin la presencia de la enzima, afectaría a la viabilidad celular.
- 10
29. Método, según la reivindicación 28, donde el polipéptido con tendencia a agregar es un péptido amiloidogénico.
- 15
30. Método, según la reivindicación 29, donde el polipéptido amiloidogénico es el A β 42.
- 20 31. Método, según la reivindicación 29, donde el péptidos amiloidogénico es una expansión de poliglutaminas.
32. Método, según la reivindicación 29, donde el péptido amiloidogénico es una variante de α -sinucleína.
- 25
33. Método, según cualquiera de las reivindicaciones de la 28 a la 32, donde la enzima es la dihidrofolato reductasa humana (h-DHFR) y el compuesto tóxico es el metotrexato (MTX).
- 30 34. Método según cualquiera de las reivindicaciones de la 28 a la 33, donde el compuesto tóxico está marcado con fluorescencia.

35. Método según cualquiera de las reivindicaciones de la 28 a la 34, donde las células de levadura han sido seleccionadas del grupo formado por *Saccharomyces uvae*, *Saccharomyces kluyveri*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces uvarum*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*,
5 *Pichia kluyveri*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida sp.*, *Candida utilis*, *Candida cacaoi*, *Geotrichum sp.* y *Geotrichum fermentans*
36. Método, según las reivindicaciones de la 28 a la 34, donde la célula de levadura es
10 *Saccharomyces cerevisiae*.
37. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores de la 28 a la 36, donde la agregación de los péptido amiloidogénicos da lugar a un grupo de enfermedades seleccionadas del grupo formado por la enfermedad del Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, polineuropatía amiloidea familiar, una taupatía, la enfermedad de los
15 Trinucleótidos, las encefalopatías espongiiformes transmisibles (EET), la enfermedad de Alzheimer (EA), y la enfermedad de Huntington (EH).

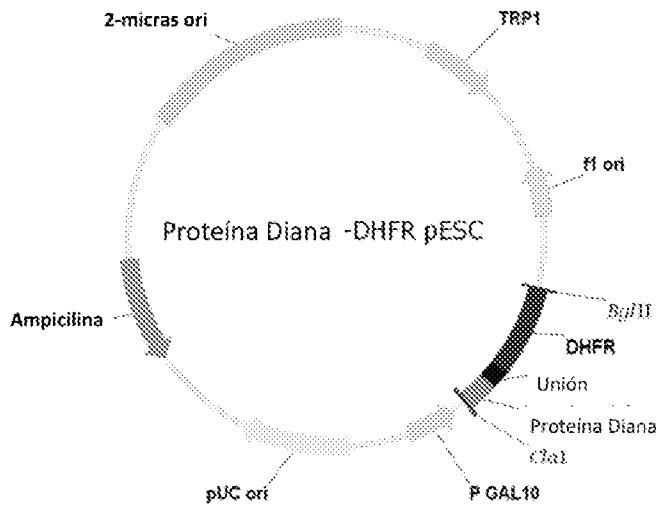


Figura 1

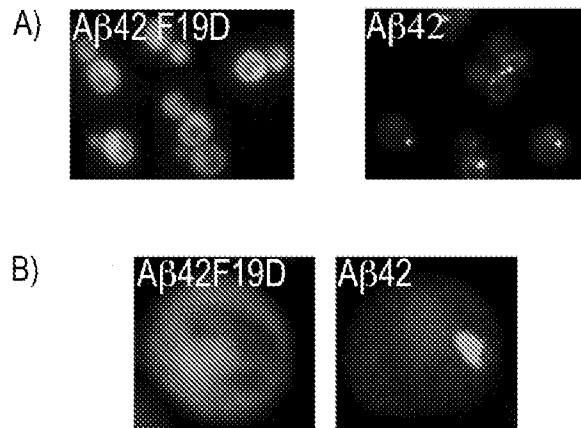


Figura 2

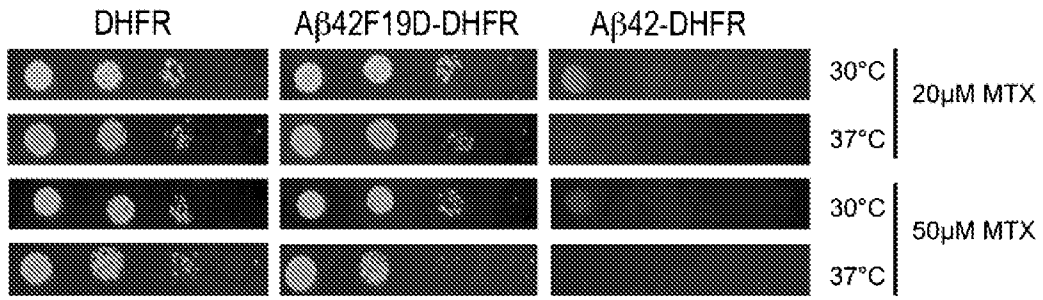


Figura 3

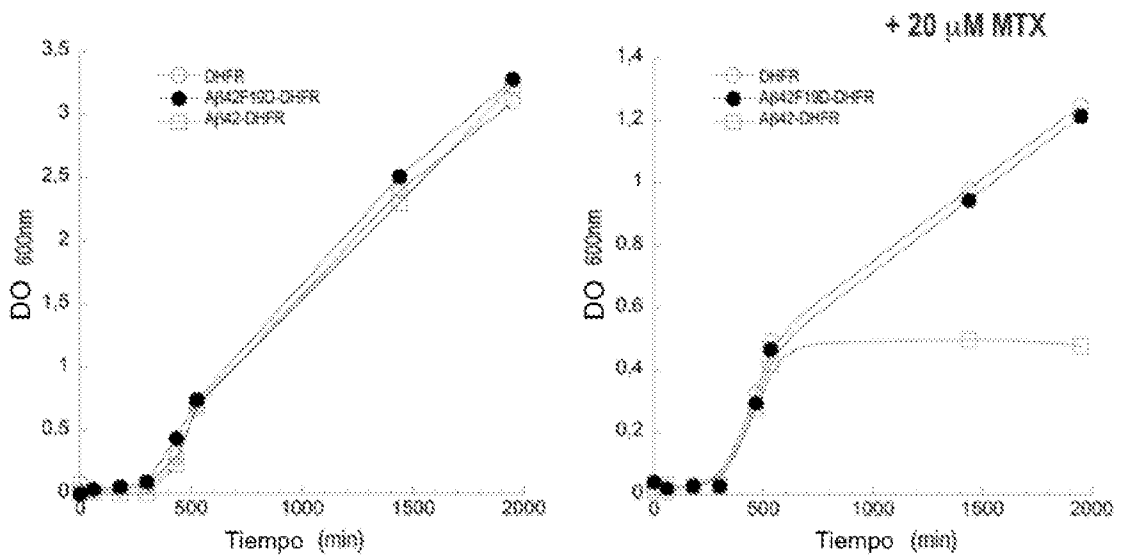


Figura 4



Figura 5

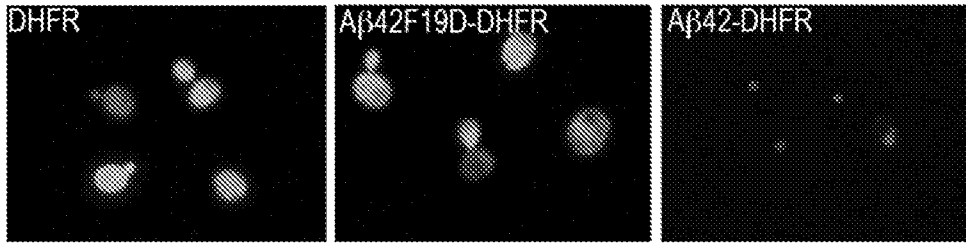


Figura 6

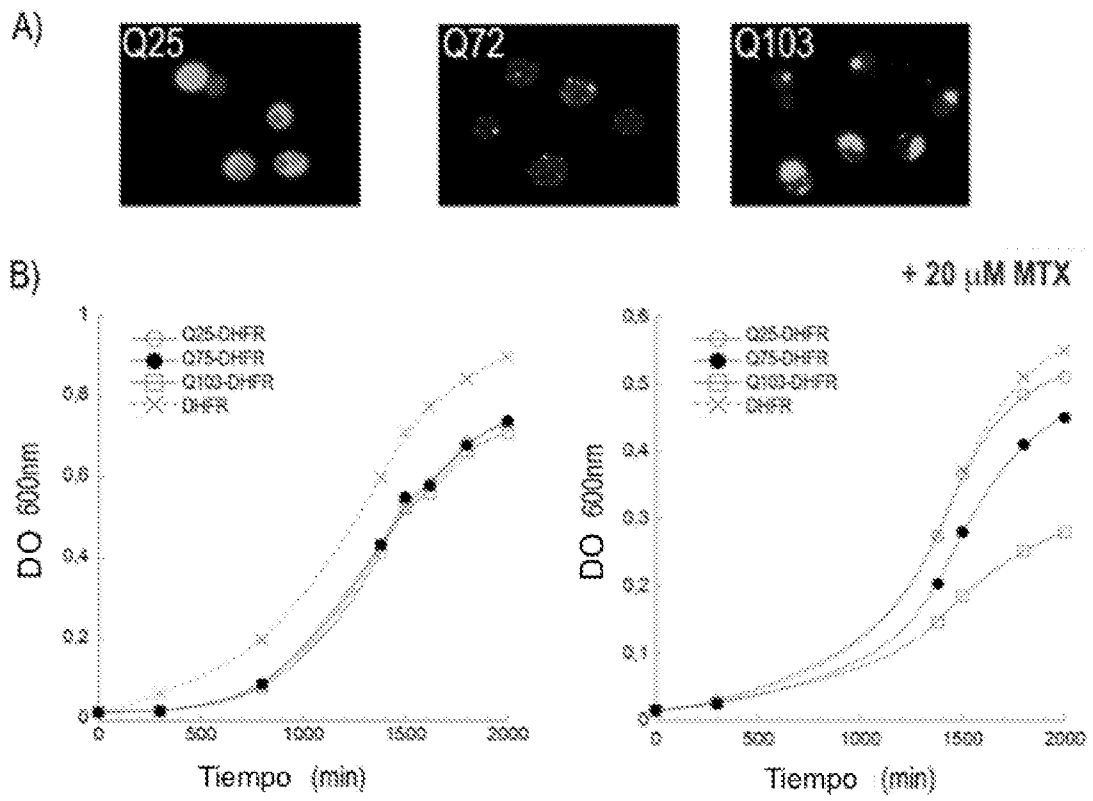


Figura 7

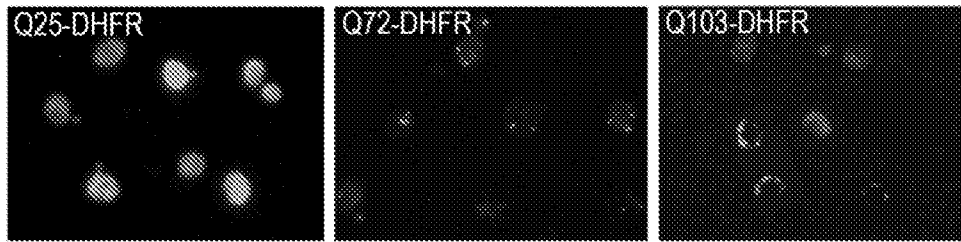


Figura 8

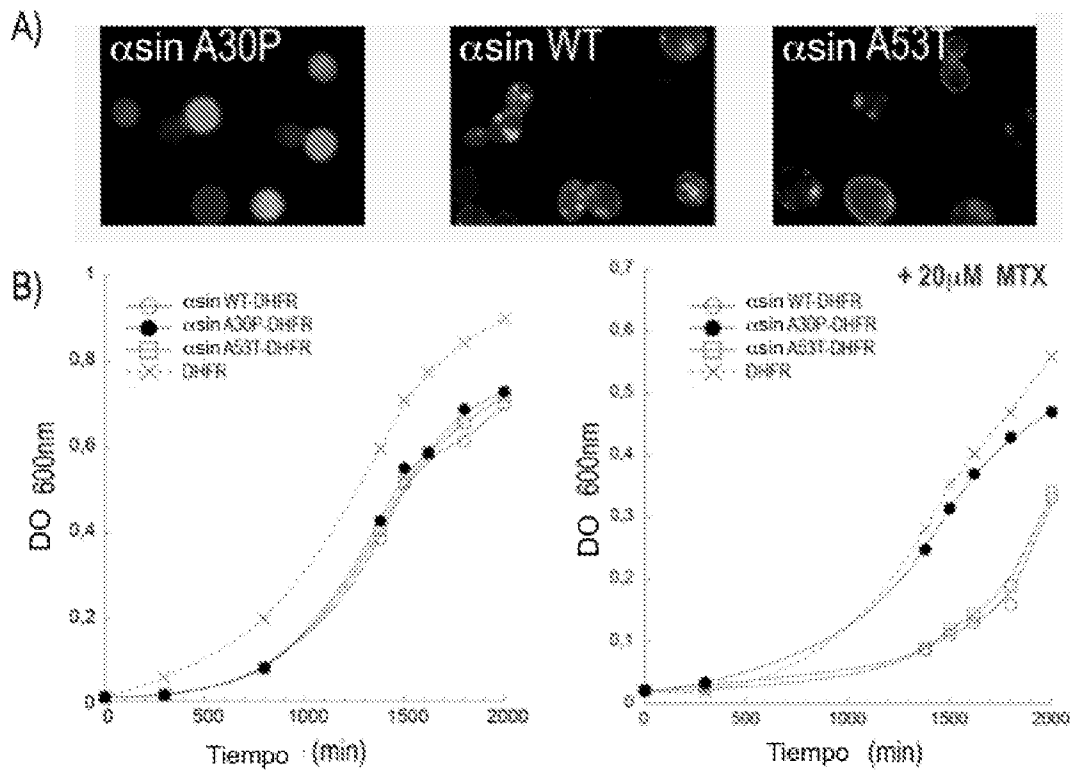


Figura 9

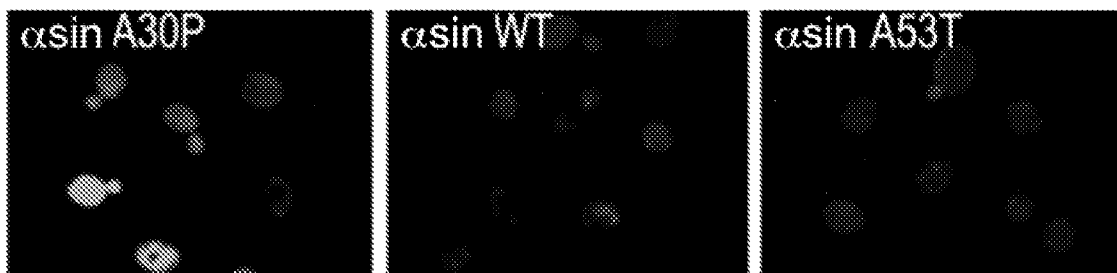


Figura 10

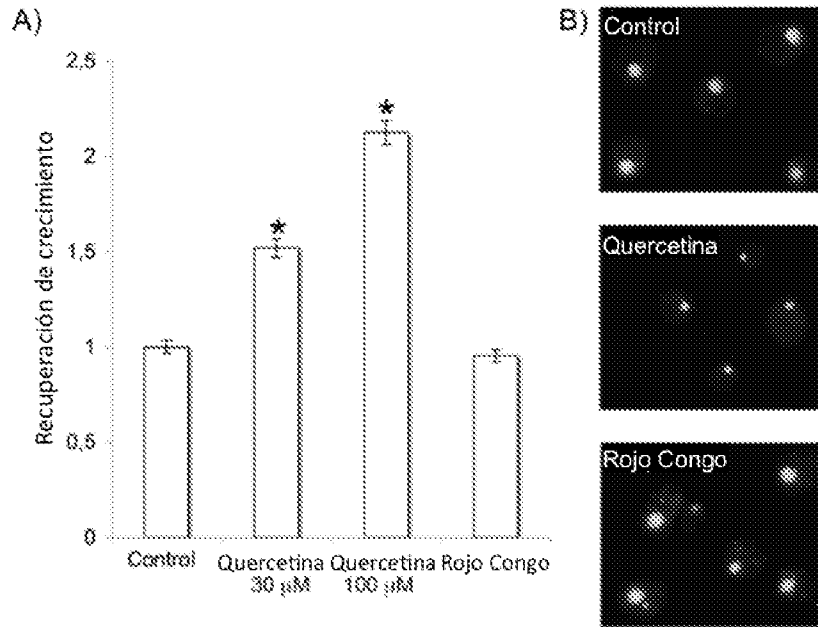


Figura 11

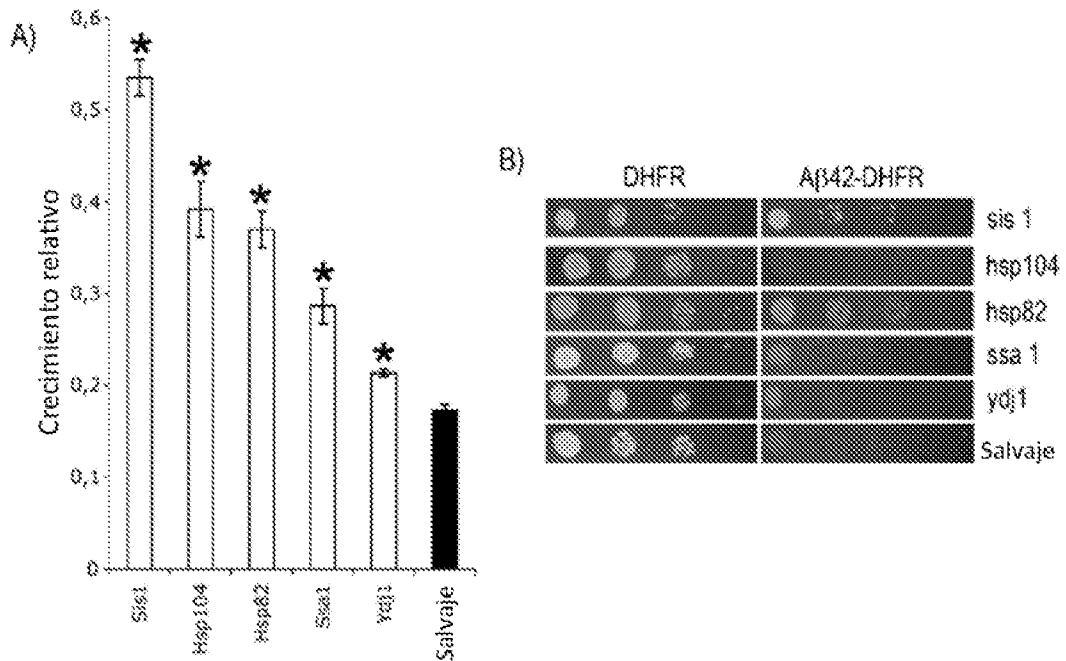


Figura 12

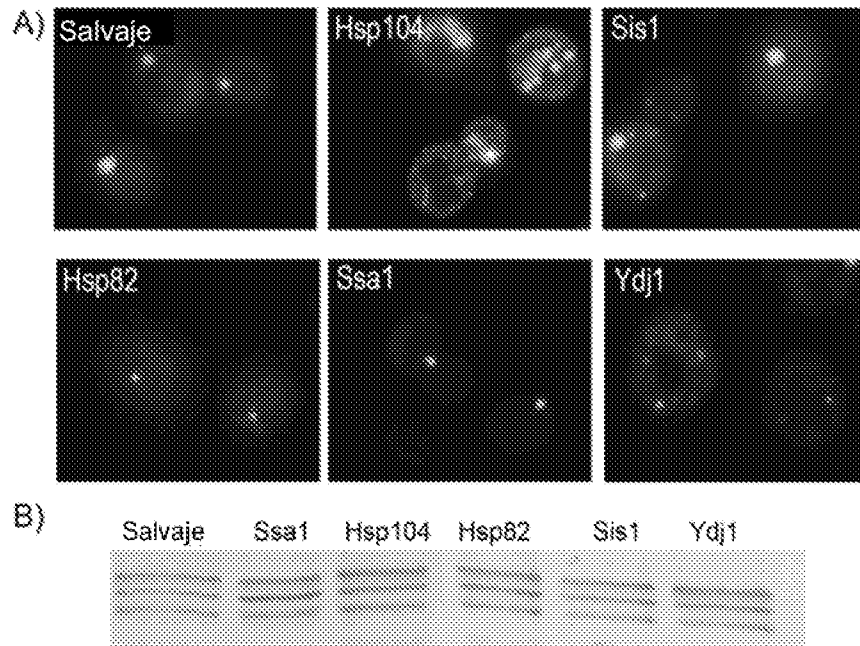


Figura 13

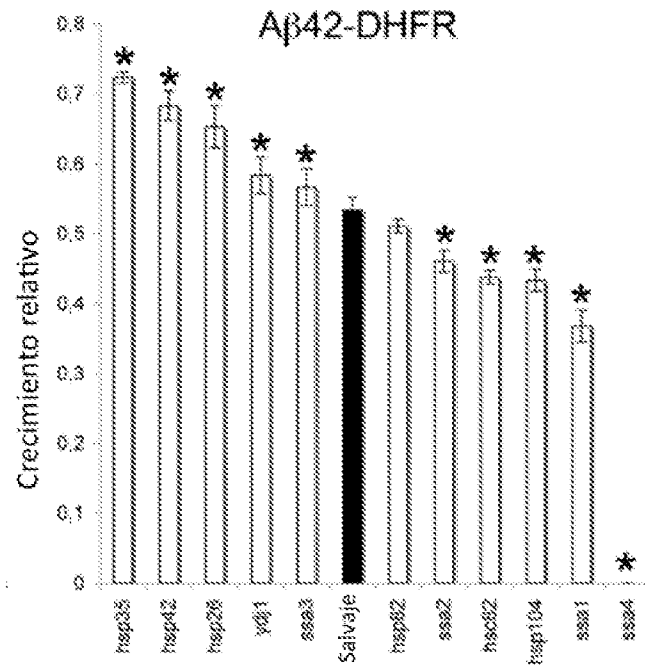


Figura 14

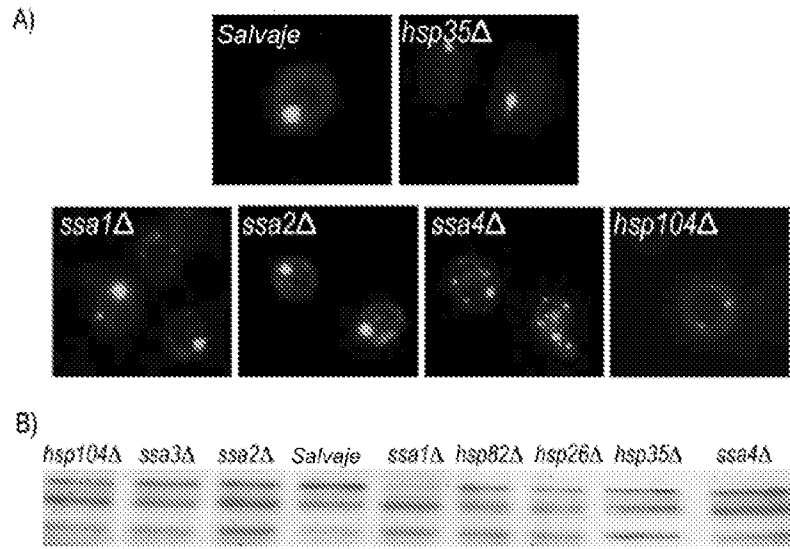


Figura 15