



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI

Treball de final de grau

Nou mètode de selecció per a la identificació d'antiprions

Víctor Cerdán Porqueras

Doble grau de biotecnologia, bioquímica i biologia molecular

Tutor acadèmic: Ricardo Cordero Otero

Tutor professional: Martí Aldea Malo

Tarragona, Juny de 2019

Universitat Rovira i Virgili

Índex

ABSTRACT	2
DADES DEL CENTRE	3
INTRODUCCIÓ	4
MALALTIES PRIÒNIQUES	4
LA MALALTIA D'ALZHEIMER	4
LA MALALTIA DE PARKINSON	5
ELS LLEVATS COM A MODEL	6
ANTECEDENTS	6
FONAMENT DEL MÈTODE	8
HIPÒTESI	10
OBJECTIUS	10
MATERIALS I MÈTODES	10
SOQUES	10
PREPARACIÓ DELS MEDIS DE CULTIU	10
PCR	11
CLEAN UP	12
LLIGACIÓ	13
TRANSFORMACIÓ	13
<i>Transformació de E. coli</i>	13
<i>Transformació de S. cerevisiae</i>	14
PURIFICACIÓ DE PLASMIDIS (MINIPREP)	15
RESTRICCIONS	16
EXTRACCIÓ DE DNA GENÒMIC	16
MICROSCOPIA	17
TEST DE VIABILITAT	19
EXTRACCIÓ DE PROTEÏNA DE <i>S. CEREVISIAE</i>	19
WESTERN BLOT	20
ESTADÍSTICA	22
RESULTATS	22
ELIMINACIÓ DE YE _{GFP} DE PYM44-PFD I ADDICIÓ DE FLAG	22
EFFECTES DE LA TRANSFORMACIÓ AMB PFDs EN EL CREIXEMENT	26
CREACIÓ D'UNA FORMA D'HA β 42 QUE NO AGREGA	27
TRANSFORMACIÓ DE HA β 42 I HA β 42M AL GENOMA DE <i>S. CEREVISIAE</i>	32
EFFECTES DE LA TRANSFORMACIÓ AMB HA β 42M EN EL CREIXEMENT	37
TRANSFORMACIÓ AMB YC _{PLAC22} , YC _{PGAL} I YC _{PGFP}	37
QUANTIFICACIÓ INDIRECTA DE L'AGREGACIÓ D'HA β 42 I HA β 42M	38
DIFERÈNCIES EN EL VOLUM CEL·LULAR	40
QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNA HA β 42 I HA β 42M	40
DISCUSSIÓ DE RESULTATS	41
CONCLUSIONS	44
AUTOAVALUACIÓ	45
INFORMACIÓ SUPLEMENTÀRIA	47
PRIMERS UTILITZATS	47
VECTORS UTILITZATS	48
REFERÈNCIES	49

Abstract

Els agregats proteics són els causants de diverses patologies humanes com la malaltia d'Alzheimer, la malaltia de Huntington o la malaltia de Parkinson. L'agregació de les proteïnes es pot produir per diversos mecanismes, i en alguns casos, presenta un caràcter priònic. Aquest caràcter priònic produeix la transmissió del mal-plegament proteic i la seva agregació exacerbant els símptomes de la malaltia. A pesar dels recents avenços en entendre com funcionen aquests mecanismes d'agregació, el nostre coneixement sobre com evitar-los i, per tant, sobre com tractar aquestes malalties és encara molt limitat. En aquest treball s'ha utilitzat *S. cerevisiae* com a model per a establir una metodologia que permeti realitzar un *screening* de pèptids que presentin propietats antipriòniques. Aquesta metodologia es basa en la hipòtesi de que variacions de les proteïnes priòniques podrien interferir en la agregació de la seva forma original, aturant el desenvolupament de la malaltia. Els resultats obtinguts mostren que el mètode de doble selecció proposat, per creixement i fluorescència, és suficientment resolutiu per a identificar pèptids mutats que evitin l'agregació. Addicionalment, s'ha observat un volum cel·lular augmentat en aquells llevats que presentaven agregats, el que suggereix que els llevats són capaços de detectar aquests agregats i aturar el seu cicle cel·lular per tal de no transmetre'ls a la descendència. Aquesta aturada del cicle seria la responsable de l'augment del volum cel·lular. Els resultats obtinguts permetran continuar la recerca per a identificar compostos antipriònics i obren una nova línia de recerca per a elucidar com els llevats són capaços de detectar i produir una resposta als agregats. Un millor enteniment en aquests camps permetria caracteritzar els mecanismes biològics en contra de l'agregació proteica i desenvolupar tractaments per a evitar-la.

Paraules clau: antiprió, llevat, β -amiloide, α -sinucleïna i agregats priònics.

Dades del centre

Aquest treball de final de grau ha estat basat en unes pràctiques extracurriculars realitzades al Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB), integrat al Parc Científic de Barcelona (PCB). L'IBMB es troba a l'edifici Hèlix localitzat al Carrer de Baldori Reixac, 2, 08028 Barcelona. L'IBMB forma part del *Consejo Superior de Investigaciones Científicas* (CSIC) que és la principal institució pública dedicada a la recerca de tota Espanya. El CSIC s'estructura al voltant de vuit àrees diferents del coneixement, essent l'IBMB part de l'àrea de biologia i biomedicina.

L'IBMB es centra en la investigació bàsica i interdisciplinària i s'estructura en quatre grans departaments: biologia estructural, regulació genòmica, biologia cel·lular i biologia del desenvolupament. Les pràctiques es van desenvolupar en el departament de biologia cel·lular que té com a objectiu estudiar els processos cel·lular bàsics per a entendre millor el desenvolupament de malalties humanes. Els grups de recerca que componen aquest departament tenen especial interès en entendre la mecànica i casuística de funcions cel·lulars a través de tècniques de microscopia, genòmica i proteòmica.

L'IBMB es troba adscrit al Ministeri de Ciència, Innovació i Universitats (MICINN) del que rep la majoria del seu finançament, tot i que també rep subvencions del Ministeri d'Economia i Empresa (MINECO). Per tant, l'IBMB és un centre de recerca públic que promou avenços científics en diferents disciplines de les ciències de la salut i de la vida.

Concretament, les pràctiques es van desenvolupar en el grup de control espacial de l'entrada al cicle cel·lular a càrrec del doctor Martí Aldea Malo. Actualment, aquest laboratori es centra en l'estudi del mal-plegament de proteïnes i l'efecte que causa l'acumulació d'agregats proteotòxics en l'envelliment cel·lular. Els projectes recents inclouen l'estudi d'agregats com inhibidors de l'entrada al cicle cel·lular, l'efecte de certes proteïnes i agregats sobre el control del volum cel·lular i el desenvolupament d'etiquetes peptídiques per al diagnosi de interaccions proteiques patològiques.

Introducció

Malalties priòniques

Els prions són isoformes de proteïnes auto-propagatives i transmissibles que s'acumulen en agregats. La hipòtesi de l'existència d'aquests prions va sorgir per explicar el mecanisme de transmissió d'un grup de malalties rares anomenades encefalopaties transmissibles espongiformes (TSEs). La hipòtesi priònica postulava que l'únic agent infecciós d'aquestes patologies és una proteïna malplegada en estat priònic (PrP^{Sc}), que es multiplica en els individus infectats transformant la versió normal de la proteïna (PrP^C) en la versió priònica. Aquesta hipòtesi va estar en dubte durant molts anys però s'ha demostrat que el material infecciós pot ser generat *in vitro*, en absència de material genètic, i aquest és capaç de transmetre el seu caràcter priònic *in vivo* (Wang et al., 2010). Els agregats de proteïnes mal plegades estan implicats en més de 20 malalties humanes, incloent la β -amiloide (A β), associada amb la malaltia d'Alzheimer; tau, associada amb la demència frontotemporal i la malaltia d'Alzheimer; l' α -sinucleïna (hSNCA), associada a la malaltia de Parkinson; la huntingtonina associada a la malaltia de Huntington, i el PrP^C, associat a la malaltia de Creutzfeldt-Jakob (Ironsides et al., 2018). A pesar de que les proteïnes involucrades en aquestes patologies i la seva simptomatologia són diferents, el mecanisme molecular del mal-plegament que es produeix és extremadament similar. Tot i l'extens coneixement sobre el mecanisme molecular d'aquestes patologies, el factor desencadenant d'aquest mal-plegament és encara desconegut, i els esforços per a prevenir o disminuir l'agregació han tingut resultats extremadament limitats (Parsons and Rammes, 2017). S'han utilitzat pèptids sintètics com inhibidors de l'agregació però sota condicions distants de les que es podrien trobar *in vivo*, i els seus efectes sobre el cervell, en ratolins, són escassos (Parthasarathy et al., 2013). D'altra banda, anticossos que reconeixen específicament els agregats són capaços d'interferir *in vitro* amb l'agregació, però no s'han pogut demostrar efectes en models cel·lulars (Gold, 2017).

La malaltia d'Alzheimer

La malaltia d'Alzheimer és una malaltia de caràcter neurodegeneratiu definida pel progressiu deteriorament cognitiu, pèrdua de memòria i trastorns conductuals. La seva etiologia no és encara clara, però una de les hipòtesis que ha pres per força en els darrers

anys és que l'acumulació de les proteïnes A β i tau és la causant de la patologia. La proteïna tau s'acumula en forma d'agregats intracel·lulars i es creu que l'agregació i acumulació es produeix per modificacions post-traduccionals com acetilacions o fosforilacions. La proteïna A β s'acumula de manera extracel·lular degut a l'adquisició d'una estructura de làmina beta. A β és el producte del processament d'una altra proteïna, anomenada *amyloid precursor protein* (APP), per α , β , γ secretases. Aquestes secretases tallen APP per diferents llocs generant diferents formes del pèptid A β . Les formes que es troben de manera més abundant en els depòsits extracel·lulars són A β 40 i A β 42, anomenades segons el nombre d'aminoàcids que les formen. D'aquestes dues isoformes, es creu que A β 42 és la principal responsable del desenvolupament de la malaltia ja que és capaç d'agregar de manera espontània i presenta una menor solubilitat i, per tant, és la que s'estudiarà en aquest treball (Calderon-Garcidueñas and Duyckaerts, 2018).

La malaltia de Parkinson

La malaltia de Parkinson és un trastorn neurodegeneratiu classificat com a trastorn del moviment. Es caracteritza per la mort neuronal a la substància negra pars compacta, el que provoca una falta de dopamina. La dopamina és un neurotransmissor clau en la regulació del moviment i el seu dèficit és el principal causant de la simptomatologia de la malaltia de Parkinson. Actualment, es desconeix que és el que provoca la mort neuronal tot i que s'ha demostrat que intervenen diferents factors genètics i ambientals. El *Gold Standard* per al diagnosi de la malaltia de Parkinson és la presència de cossos de Lewy en el sistema nerviós central. Els cossos de Lewy són agregats de proteïnes d'entre les quals destaca l'hSNCA. No es coneix exactament la relació de l'agregació de l'hSNCA amb el desenvolupament de la malaltia, tot i que es creu que en podria ser una de les principals causes (Kalia and Lang, 2015). L'hSNCA és una proteïna de 140 aminoàcids codificada pel gen *Snc1*. El seu rol fisiològic no està caracteritzat però es creu que desenvolupa funcions en la plasticitat neuronal i en el transport de neurotransmissors. En condicions fisiològiques existeixen diferents conformacions de la proteïna que presenten diferents graus de solubilitat. L'acumulació de les conformacions més insolubles podria ser el causant de l'oligomertització de la proteïna provocant fibres β . Així doncs, la proteïna agrega quan es troba en una conformació de làmina β , tal i com

passava amb A β . Algunes mutacions que faciliten la formació de làmines beta són les responsables de la variant familiar de la malaltia de Parkinson, posant en evidència l'estreta relació entre l'agregació i el desenvolupament de la malaltia. L'agregació de l'hSNCA es produeix únicament en neurones dopaminèrgiques, pel que es creu que el metabolisme de la dopamina podria tenir un paper rellevant en la formació dels cossos de Lewy (Melo et al., 2018).

Els llevats com a model

El desenvolupament de models cel·lulars i animals que reproduïxin fidelment la neurodegeneració ha sigut de vital importància per a entendre millor aquestes patologies. *Saccharomyces cerevisiae*, que també presenta processos priònics, representa un magnífic *toolbox* per a avaluar possibles moduladors i inhibidors de l'agregació priònica. S'ha observat que diverses proteïnes de llevat existeixen en una forma "normal" soluble i en una forma transmissible amiloide, aquests prions representen un model per a estudiar els mecanismes d'agregació amiloide i les seves conseqüències funcionals, aplicable a malalties de mamífers i, en últim terme, humanes (Tenreiro et al., 2013).

Les proteïnes priòniques contenen dominis anomenats "*prion-forming domains*" (PFDs), que són essencials per a la formació, propagació i estabilitat del prió. Aquests dominis els trobem tant en proteïnes de llevat com SUP35, com en humanes com A β . SUP35 és la proteïna priònica més utilitzada per a l'estudi de malalties neurodegeneratives en llevats. La substitució del domini PFD de SUP35 pel d'altres proteïnes priòniques d'interès permet estudiar l'agregació de proteïnes humanes en *S. cerevisiae* (Newby et al., 2017). Així doncs, els llevats són un bon organisme model per a l'estudi de malalties priòniques humanes i permeten fer *screenings* extremadament eficients i amb un reduït cost econòmic.

Antecedents

Es va intentar realitzar un *screening* amb el mètode proposat per Alberti et al., 2009. SUP35 és una proteïna responsable de la terminació de la transcripció, de manera que quan es troba agregada no pot exercir correctament la seva funció. Aleshores, utilitzant marcadors d'auxotròfia que presenten un codó de STOP prematur podem saber si la

cèl·lula presenta la forma activa de SUP35. En el cas de que SUP35 no es trobi agregat provocarà una terminació prematura de la transcripció del gen d'auxotròfia com per exemple, *Ade1-14* o *Ura3-14*. D'aquesta manera, les cèl·lules que presentin monòmers de SUP35, i per tant puguin realitzar la terminació de la transcripció, no seran capaces de créixer en plaques deficientes en uracil i adenina. Addicionalment, es provoca un canvi de fenotip fàcilment observable ja que les colònies que no poden sintetitzar adenina tenen una acumulació d'intermediaris de la via de síntesi d'adenina de color vermell. Així doncs, fusionant la proteïna de la que es vol estudiar el caràcter priònic al domini PFD de SUP35, es pot avaluar fàcilment l'agregació. D'aquesta manera els autors van identificar una gran quantitat de proteïnes que podrien ser prions (Alberti et al., 2009).

Aplicant aquest sistema per a estudiar possibles inhibidors de l'agregació, que tinguessin una estructura similar a la del prió, només caldria realitzar mutacions en la seqüència del prió i introduir-la en una soca que expressés el PFD sense mutar. En el cas de que la mutació protegís de la agregació, els llevats adquiririen una coloració vermella degut a l'existència de la forma monomèrica de PFD-SUP35, que provocaria una terminació prematura dels gens *Ade1-14* i *Ura3-14*. Estudiant les mutacions presents en les colònies vermelles s'identificarien possibles candidats (Figura 1). També es pot afegir *green fluorescence protein* (GFP) als PFD mutats per a poder fer un seguiment intracel·lular.

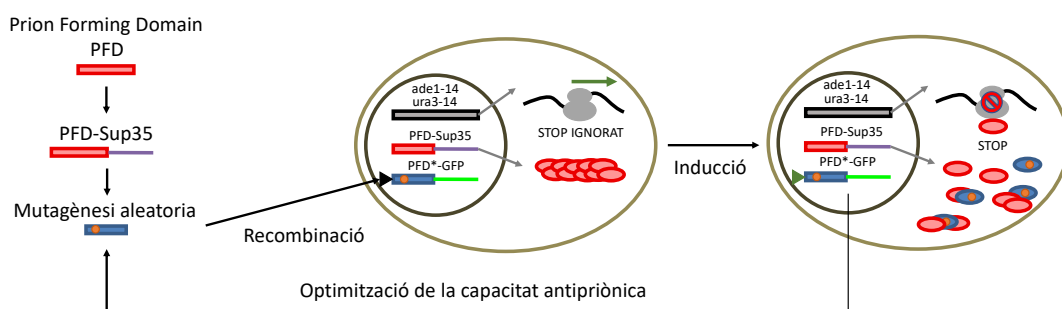


Figura 1: Metodologia utilitzada anteriorment en el laboratori per a la identificació de molècules amb caràcter priònic.

Tot i l'èxit d'aquest mètode per a la identificació de possibles molècules priòniques, va demostrar no ser suficientment sensible per a estudiar la capacitat antipriònica de pèptids.

Fonament del mètode

Donada la manca de sensibilitat del mètode anterior, es va decidir provar altres metodologies proposades a la bibliografia. La més prometedora és la metodologia yTRAP (*yeast transcriptional reporting of aggregating proteins*) ja que permet fer avaluacions extremadament sensibles, quantitatives i amb *high-throughput* (Newby et al., 2017).

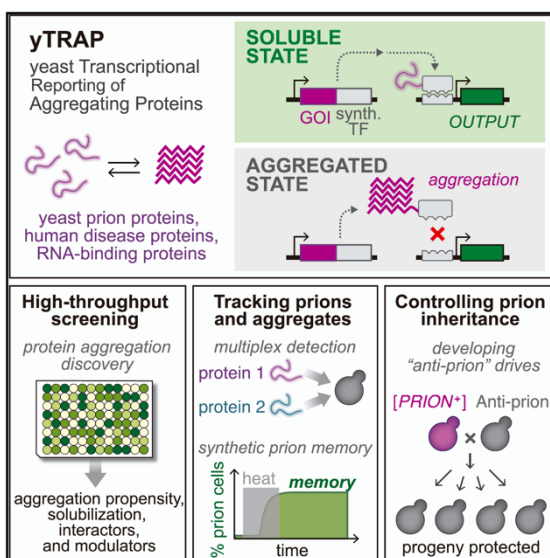


Figura 2: Esquema informatiu sobre els principis bàsics de la metodologia yTRAP i les seves aplicacions (Newby et al., 2017).

Aquest mètode es basa en fusionar el gen que codifica per la proteïna que es vol estudiar (GOI: *gene of interest*) a un factor de transcripció sintètic. Aquest factor de transcripció, en la seva forma soluble, activarà la transcripció d'un gen reporter. En el cas de que la proteïna sotmesa a estudi agregui, el factor de transcripció no podrà realitzar la seva funció i no hi haurà senyal del gen reporter. Aquest mateix mètode es pot adaptar per a que segueixi una lògica reversa, en la que el promotor sintètic es troba regulant l'expressió del repressor TetR, que al seu temps regularà l'expressió del gen reporter repressible Tet. En aquest cas, quan la proteïna d'estudi agregui, no es sintetitzarà el repressor TetR, de manera que estarà activada l'expressió del gen reporter controlat pel promotor repressible Tet.

Partint d'aquesta mecànica bàsica, s'ha adaptat el mètode anterior per a fer servir un activador de la transcripció endogen de *S. cerevisiae*: GAL4.

GAL4 és un proteïna que activa l'expressió de gens induïts per la presència de galactosa com *Gal1*, *Gal2*, *Gal7*, *Gal10* i *Mel1* que codifiquen per enzims responsables de la conversió de la galactosa en glucosa. Aquests gens es troben controlats per un promotor comú anomenat *Gal4p* i la seva transcripció s'activa quan GAL4 s'hi uneix (Ren et al., 2000).

Mitjançant recombinació homòloga es fusionarà el PFD a l'extrem C terminal del gen *Gal4* fent desaparèixer el codó d'STOP propi. D'aquesta manera s'expressarà una proteïna quimèrica que contindrà GAL4 i PFD units. Addicionalment, es realitzarà una transformació amb un plasmidi que contingui el gen *Gfp* sota el control del *Gal4p*. A continuació, es sotmetrà a mutagènesi aleatòria el gen del PFD i s'introduirà en un plasmidi sota control d'un promotor d'expressió constitutiva.

D'aquesta manera, en plaques que només presentin galactosa com a font de carboni no creixeran aquells llevats que tinguin agregats, fent així una primera selecció per creixement. La fluorescència, al ser quantificable, permet avaluar de forma indirecta l'expressió de gens regulats per GAL4 i, per tant, la quantitat de GAL4 lliure. Partint d'aquest supòsit, aquells llevats que tinguin una major fluorescència hauran incorporat un antiprió més eficaç ja que hi haurà més forma soluble de GAL4. Permetent fer així una doble selecció (Figura 3).

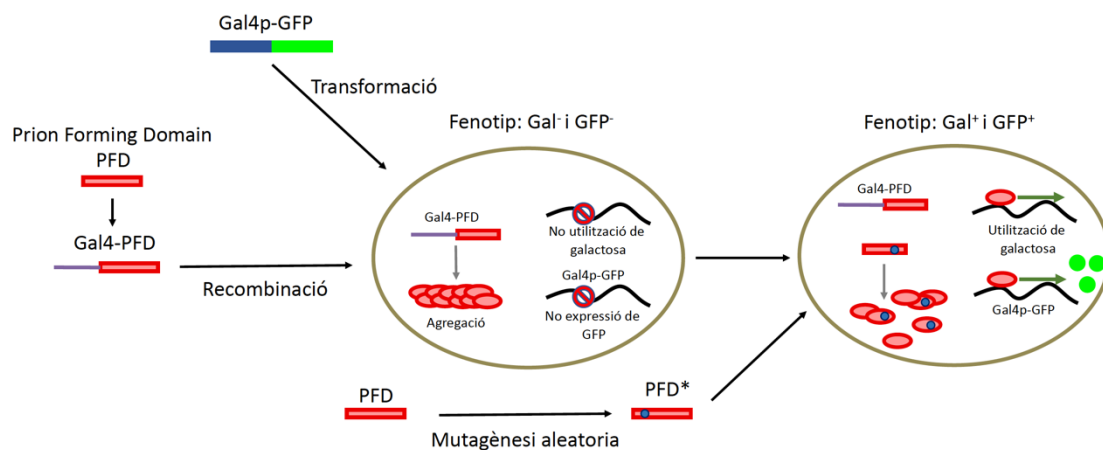


Figura 3: Esquema de la metodologia proposada per a la identificació de pèptids amb propietats antiprioniques.

Un cop detectats aquells llevats que han incorporat antiprions es realitzarà una seqüenciació per a identificar les mutacions corresponents. Partint d'aquest mutant es podrien realitzar successives mutagènesis i *screenings* per tal de optimitzar l'eficàcia.

Hipòtesi

S'hipotetitza que es poden formar inhibidors de prions a partir de dominis priònics que siguin capaços d'unir-se eficientment als agregats però no transmetin el plegament patològic a altres proteïnes.

Objectius

Els objectius principals són la construcció de soques de llevats que presentin diferents PFDs fusionats al gen *Gal4* per a determinar la validesa del mètode d'*screening* i la transformació amb PFD sotmesos a mutagènesi aleatòria per tal d'identificar possibles candidats a antiprions.

Materials i mètodes

Soques

La soca de *S. cerevisiae* que s'ha utilitzat és W303-1A que té les següents característiques genètiques: *MATa {leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15}*. La soca d'*E. coli* que s'ha utilitzat és la *DH5α competent cells* adquirida a *Thermo-Fisher* (Cat: 18265017).

Preparació dels medis de cultiu

Es va preparar la quantitat de medi corresponent a un litre de medi *lysogeny broth* (LB). Es van necessitar 10 g de triptona, 10 g de NaCl, 5 g d'extracte de llevat i 150 g d'agar. Es van pesar els components sense l'agar i es van dissoldre en aigua Mili-Q (MQ) sense arribar al volum final. Es va mesurar el pH i es va ajustar per a que estigués a 7,5. Es va afegir l'agar i es va enrasar amb aigua MQ fins al volum d'un litre. Es va autoclavar el medi i es va deixar refredar fins a 50°C. En cas de que es necessités afegir antibiòtic al medi, aquest es va afegir un cop es trobava a 50°C per evitar la seva degradació. La concentració d'ampicil·lina final va ser de 100 µg/L. Es van repartir 25 ml de medi a cada placa de 90 mm en una campana estèril. Es va deixar reposar fins que el medi va solidificar i es van guardar les plaques a 4°C. Per a la preparació de medis líquids es va realitzar el mateix procediment sense afegir l'agar.

El medi *yeast extract peptone dextrose* (YPD), *yeast extract peptone galactose* (YPGal) i *yeast extract peptone raffinose* (YPRaf) tenen la mateixa base i només varia el sucre que se'ls hi afegeix. Per a la preparació un litre de medi es van requerir 22 g de peptona, 11 g de extracte de llevat i 22 g d'agar. Es van afegir 20 g del sucre desitjat: glucosa, galactosa i rafinosa, respectivament. El procediment seguit a partir d'aquest punt va ser el mateix que el de preparació de plaques amb medi LB.

Per a la preparació del medi *synthetic complete* (SC) es van requerir 7,37 g de base de nitrogen de llevat sense aminoàcids, 0,66 g de *Drop-out* (barreja de suplementes d'aminoàcids) i 22 grams d'agar. El *Drop-out* pot variar en funció de si es volen preparar plaques de selecció per auxotròfia. El procediment seguit a partir d'aquest punt va ser el mateix que el de preparació de plaques amb medi LB.

PCR

En aquest treball s'han realitzat tres tipus de PCR diferents. Les que requerien una major fidelitat es van realitzar fent servir la *Phusion polymerase* de *Thermo-Fisher* (Cat: F530S) mentre que les *colony* PCR i les que requerien menor fidelitat es van realitzar amb la *DreamTaq polymerase* de *Thermo-Fisher* (Cat: EP0703). La única variació entre els protocols són els diferents volums de reacció, les polimerases utilitzades i el *buffer* utilitzat. En el cas de les PCR realitzades amb la *Phusion* es va fer servir el *buffer 5x High Fidelity*, mentre que a les *colony* PCR es va fer servir el *DreamTaq green buffer 10x* que permet carregar directament el producte de la PCR en el gel d'agarosa. Per a la resta de PCRs es va fer servir el *DreamTaq Buffer 10x*. Les quantitats requerides de cada reactiu es poden veure en la Taula 1.

El volum de DNA es va ajustar en funció de la concentració de la mostra. En els casos en que es van fer servir volums superiors a 1 µl es va compensar restant el volum en excés del volum d'aigua requerit. En el cas de la *colony* PCR la quantitat de DNA era variable ja que es picaven les colònies directament al *strip* de PCR, es tancava l'*strip* i s'escalfava al microones durant 2 min per tal de trencar la paret i membrana cel·lular i alliberar el DNA. En les PCRs realitzades amb la *DreamTaq Polymerase* es va determinar la temperatura d'*annealing* restant 5°C a la de *melting* mentre que en les realitzades amb

la *Phusion* es va considerar que la temperatura d'*annealing* era la de *melting* sumant 3°C.

Taula 1: Quantitats que cal incloure de cada reactiu per a realitzar cadascuna de les PCRs fetes en aquest treball. Els volums especificats fan referència a les quantitats necessàries per a una sola reacció de PCR.

	<i>DreamTaq</i>	<i>DreamTaq colony</i> PCR	<i>Phusion</i>
Volum de reacció	50 µl	20 µl	50 µl
Aigua	37,75 µl	15,5 µl	32,5 µl
<i>Buffer</i>	5 µl	2 µl	10 µl
dNTPs	5 µl	2 µl	5 µl
<i>Primer forward</i>	0,5 µl	0,2 µl	0,5 µl
<i>Primer reverse</i>	0,5 µl	0,2 µl	0,5 µl
Polimerasa	0,25 µl	0,1 µl	0,5 µl
DNA	10 ng en 1 µl	Variable	10 ng en 1µl

Clean up

Per a realitzar els *clean up* es va fer servir el kit comercial *NucleoSpin Gel and PCR Clean up* de *Macherey-Nagel* (Cat: 740609.250). Si el volum del producte de PCR era inferior a 30 µl es va afegir aigua fins a 50-100 µl abans de iniciar el *clean up*. Es va barrejar un volum de la mostra de PCR amb dos volums del *buffer* NT1. Es van col·locar les columnes dins dels tubs de col·lecció i es van carregar fins a 650 µl de mostra (en el protocol s'especifica un màxim de 700 µl però 650 µl causen menys problemes a l'hora de tancar les columnes). Es van centrifugar les columnes a 11000 x g durant 30 s i es va descartar el líquid que va travessar les columnes. En cas de que quedés mostra per passar per les columnes es va repetir aquest pas. Es van afegir 650 µl de *buffer* NT3 a les columnes i es van centrifugar a 11000 x g durant 30 s. Es va descartar el líquid que havia travessat les columnes i es va repetir el rentat amb *buffer* NT3. Es van centrifugar les columnes 1 min a 11000 x g per a eixugar-les completament. Es van incubar les columnes eixutes durant 3 min a 70°C per tal d'eliminar tot l'etanol possible. Es van col·locar les columnes en tubs d'1,5 ml nous i es van afegir entre 15-30 µl de *buffer* d'elució NE. Es va realitzar una incubació a temperatura ambient durant 1 min i es va centrifugar a 11000 x g durant 1 min. En els casos en que la quantitat de DNA era limitant es va repetir el pas d'elució amb la incubació a 70°C durant 5 min, aquest pas és recomanat especialment amb fragments de DNA grans (>1000 pb).

El *buffer* NT3 s'ha de preparar prèviament amb l'addició del volum d'etanol 96-100% indicat. En aquest treball s'ha fet servir el kit per a 250 mostres pel que es van afegir 200 ml d'etanol a cada ampolla de *buffer* NT3.

Lligació

Per a la lligació es va fer servir la T4 DNA *ligase* de Roche (Cat:10481220001). Es van realitzar els càlculs per a agafar un màxim de 1 µg de DNA a lligar i es van afegir 3 µl de *buffer* de lligació 10x, 3,5 µl de T4 DNA *ligase* (1U/µl), 2 µl d'ATP 15 mM i es va completar el volum de reacció fins a 30 µl amb aigua MQ.

Segons el protocol de la casa comercial l'ATP no és necessari perquè el *buffer* de lligació ja en porta, però s'ha observat que afegint ATP s'obtenen lligacions molt més ràpides. Es va deixar incubant la barreja a 37°C durant 30 min. El protocol de lligació de la casa comercial especifica que aquesta incubació s'ha de realitzar entre 16 i 25°C *overnight*. La lligació va resultar problemàtica pel que es van realitzar variacions d'aquest protocol en les que s'afegia més quantitat de ligasa (fins a 5 µl) o es va realitzar la incubació *overnight* a 16°C. També es va afegir un 15% de polietilenglicol (PEG) (w/v) ja que el protocol suggereix aquesta mesura per a augmentar l'eficiència.

Transformació

Transformació de *E. coli*

Les cèl·lules competents són DH5α adquirides a *Thermo-Fisher* i es troben al·liquotades en tubs de 1,5 ml a -80°C. Tot aquest procediment es va realitzar en condicions estèrils. Es va descongelar una al·liquota per a cada transformació. Un cop descongelada es van afegir entre 0,5 i 10 µl del vector de manera que hi hagués entre 1-10 ng de DNA del plasmidi. Es va agitar la mescla suaument (sense pipetejar) i es va deixar incubant 30 min en gel. A continuació, es va realitzar un xoc tèrmic d'entre 45 i 60 s a 42°C en un termobloc. Es va tornar a agitar suaument i es va deixar incubant en gel durant 5 min. Es van afegir 950 µl de medi LB i es va deixar una hora a 37°C a 180 rpm d'agitació. Es van centrifugar les mostres 2 min a 5000 rpm, es va descartar el sobrenedant per decantació i van resuspendre les cèl·lules en el líquid restant en tubs d'1,5 ml. Es van sembrar les cèl·lules en plaques amb medi LB-agar amb ampicil·lina. Es van deixar créixer *overnight* en un incubador a 37°C. Es van picar les colònies que van créixer i es van

replaquejar en plaques noves d'agar LB amb ampicil·lina. També es van inocular en un tub de 15 ml amb 3 ml de medi LB líquid amb ampicil·lina per a realitzar una posterior purificació del vector i validació de la transformació.

Transformació de *S. cerevisiae*

La transformació en llevats es pot dur a terme amb diferents protocols i aproximacions, el protocol fet servir es basa en la combinació de l'ús d'acetat de liti (LiAc), DNA monocatenari (ssDNA) i PEG. Abans d'iniciar el protocol es va comprovar que les mostres no presentessin contaminació evident mirant pel microscopi. Es van preparar els reactius a partir d'estocs estèrils, per cada mostra es van preparar els següents reactius:

- 100 µl de Tris-EDTA (TE): Es van barrejar 10 µl de TE 10x amb 90 µl d'aigua MQ.
- 1 ml de TE/LiAc: Es van barrejar 0,1 ml de TE 10x amb 0,1 ml de LiAc 1M pH 7,5 i 0,8 ml d'aigua MQ.
- 1 ml de PEG 40%: Es van barrejar 0,1 ml de TE 10x, amb 0,1 ml de LiAc 1M pH 7,5 i 0,8 ml de PEG 50%.

Es pot dividir aquest protocol en dues parts:

- Preparació del DNA d'interès: Es va preparar i purificar el DNA d'interès mitjançant una purificació de plasmidi o PCR *clean up*, l'elució final del DNA en ambdós protocols es va realitzar amb 40 µl de *buffer* TE. Per a transformacions amb plasmidis es van utilitzar 100 µg de DNA mentre que per a recombinació genòmica es va utilitzar 1 µg del producte de PCR. En tots els casos es va preparar un control negatiu en el que només hi havia el *buffer* TE. Es va afegir a cada mostra 5 µl de ssDNA a concentració de 10mg/ml prèviament incubat 2 min a 90°C. Es va afegir 5 µl de LiAc 1M, es va agitar la barreja i es va realitzar un *spin*.
- Preparació *S. cerevisiae*: Es va créixer la soca d'interès en 10 ml de medi líquid YPD *overnight* a 30°C i 180 rpm. És important que les soques es trobin al mig de la fase de creixement exponencial per a millorar l'eficiència de la transformació pel que es va utilitzar l'espectrofotòmetre per a mesurar la concentració de cèl·lules. Idealment la concentració de cèl·lules oscil·larà entre 0,4-0,6 OD/ml. Per a cada transformació es necessiten 6 OD, es va calcular el volum necessari

per a tenir aquesta quantitat de cèl·lules i es va centrifugar 2 min a 2500 rpm. Es va descartar el sobrenedant i es va resuspendre el pellet en 2 ml d'aigua MQ. Es va realitzar una altra centrifugació en les mateixes condicions i es va resuspendre en 800 µl de TE/LiAc. Es va separar el volum en dos tubs de 1,5 ml i es va centrifugar a 2500 rpm durant 2 min. Es va descartar el sobrenedant. Es va resuspendre el pellet amb els 50 µl de DNA preparats prèviament o amb el control negatiu.

Un cop els preparatius van estar realitzats es van afegir 300 µl de 40% PEG en TE/LiAc a cada mostra i es va barrejar amb la pipeta. Es van incubar les mostres 30 min a 30°C a 180 rpm. A continuació, es van incubar les mostres a 42°C durant 15 min. Després de la incubació a 42°C durant 15 min es van centrifugar les mostres a 2500 rpm durant 2 min, es va descartar el sobrenedant i es va resuspendre en 100 µl d'aigua MQ. Es van plaquejar en dues plaques de selecció diferents 50 µl i 100 µl de les mostres per a assegurar-nos l'obtenció de colònies aïllades. Es van incubar les plaques a 30°C durant 2-3 dies fins a l'aparició de colònies aïllades.

Purificació de plasmidis (Miniprep)

Per a purificar els plasmidis es va fer servir el kit comercial *Nucleospin plasmid* de *Macherey-Nagel* (Cat: 740588.250). En aquest treball s'ha partit sempre de cultius en plaques d'agar. Es va agafar el màxim possible del cultiu d'*E. coli* que cabia en una nansa de sembra de cèrcol i es va dissoldre en 250 µl de *buffer* A1, remenant i vortexant per a eliminar tots els grumolls possibles. Es van afegir 250 µl de *buffer* A2 i es va barrejar per inversió 6-8 cops. Es va deixar incubant 5 min a temperatura ambient. Es van afegir 300 µl de *buffer* A3 i es va barrejar per inversió 6-8 cops fins que desapareixia el color blau del *buffer* A2. Es va centrifugar 10 min a 4°C i velocitat màxima. Es va decantar el sobrenedant a la columna prèviament posada en un tub de col·lecció i va centrifugar a 11000 x g durant 1 min. Es va descartar el líquid que havia passat a través de la columna. Es van afegir 500 µl de *buffer* AW preescalfat a 50°C, es va centrifugar a 11000 x g durant 1 min i es va descartar el líquid que havia travessat la columna. Es van afegir 600 µl de *buffer* A4, prèviament suplementat amb etanol, i es va centrifugar a 11000 x g durant 1 min. Es va descartar el líquid que havia passat a través de la columna i es va tornar a

centrifugar a 11000 x g durant 2 min per a eixugar la columna. Es va canviar la columna a un tub de 1,5 ml i es van afegir 30 µl de *buffer* AE. Es va incubar el *buffer* AE 2 min a 70°C i es va centrifugar a 11000 x g durant 1 min.

Restriccions

Les restriccions s'han realitzat amb enzims de restricció convencionals i enzims de restricció *FastDigest*. Per a escollir les dianes de restricció es va tenir en compte els efectes de la metilació sobre la seva digestió. Tots els enzims van ser adquirits a *Thermo-Fisher*: *DpnI*, *EcoRV*, *FastDigest Ehel*, *XhoI*, *XbaI*, *NotI*, *FastDigest HindIII*. Les restriccions es van realitzar seguint el protocol proporcionat per la casa comercial. En el cas de les restriccions amb enzims *FastDigest* es va fer servir un tampó de digestió especial (*FastDigest Green Buffer 10x*) que permet carregar directament les mostres en un gel d'agarosa. En el cas de dobles digestions es va utilitzar el software *DoubleDigest Calculator* de *Thermo-Fisher* per a escollir el *buffer* idoni i les proporcions de cada enzim de restricció. Per exemple, per a la doble digestió de pYM44-sPFD1-FLAG amb *XbaI* i *HindIII* es van fer servir 2 µl de *buffer* Tango, 2 µl de *XbaI*, 4 µl de *HindIII*, 300 ng de DNA i el volum restant d'aigua fins a 20 µl. Un cop realitzat aquest mix es va vortexar suaument i es va incubar durant 1 h a 37°C. Un cop acabada la restricció es realitza un *clean up* per a evitar que es realitzessin digestions inespecífiques.

Extracció de DNA genòmic

Es van inocular les soques de les que es volia extreure el DNA genòmic en 10 ml de medi YPD i van deixar créixer fins que van saturar el medi. Es van centrifugar les cèl·lules 2 min a 2500 rpm, es va descartar el sobrenedant i es va resuspendre en 0,5 ml d'aigua MQ. Es van transferir les cèl·lules a un tub de 1,5 ml i es va realitzar un *spin* de 5 s per a que formessin un pellet. Es va descartar el sobrenedant per decantació i es van afegir 150 µl de TE 1x i 150 µl de *glass beads* (aproximadament). Les *glass beads* es van agafar amb una punta de 1000 µl a la que se li havia tallat l'extrem inferior. Es van passar els tubs pel *FastPrep* amb 3 cicles de 10 s a velocitat 5 m/s . Es van afegir 0,2 ml de *buffer* A (2% TritonX-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8) i 0,2 ml de fenol: cloroform: isoamil alcohol (25:24:1). Aquest últim pas es va realitzar en campana extractora de gasos. Es van segellar els tubs amb parafilm i es van vortexar

durant 1 min. Es van centrifugar 5 min a velocitat màxima i es va transferir un màxim de 400 µl de la fase aquosa (fase superior) en un tub nou, en la campana d'extracció de gasos. Es va afegir 1 ml d'etanol 100% a la fase aquosa i es van barrejar els tubs per inversió. Es van centrifugar 10 min a 4°C a velocitat màxima i es va descartar el sobrenedant. Es va resuspendre el pellet en 400 µl de TE 1x. Es van afegir 40 µl de NaOAc 3M, es va barrejar i es va afegir 1 ml d'etanol 100%. Es va centrifugar 10 min a velocitat màxima, es va descartar el sobrenedant i es va resuspendre el pellet en 1 ml d'etanol 70%. Es va barrejar i centrifugar 10 min a 4°C a velocitat màxima, es va descartar el sobrenedant i es va eixugar el pellet posant els tubs oberts en una bomba de buit a 30°C durant 15 min. Es va resuspendre el pellet eixut en 50 µl de TE 1x estèril. Es van afegir 2 µl de RNAasa A adquirida a *Thermo-Fisher* (Cat: EN0531) i es va incubar 5 min a 37°C. Les mostres es van guardar a -20°C fins a ser utilitzades.

Microscopia

Es van preparar precultius dels transformants que es volen estudiar 3 dies abans d'anar al microscopi. Les soques es van innocular en el medi líquid corresponent i es van deixar créixer en tubs de 15 ml durant 48 h. 24 h abans d'anar a la unitat de microscopia es van preparar els cultius a partir d'aquests precultius. La quantitat de inòcul que necessària per a cada cultiu es va calcular per a que a l'hora del microscopi les cèl·lules es trobessin a una concentració de 0,5-0,8 OD ja que això significa que es troben en fase exponencial de creixement i és quan hi ha una major expressió dels plasmidis. La soca *wild type* W303-1A es divideix aproximadament cada 2,5 h, mentre que la transformada amb hAβ42 triga el doble en dividir-se. El càlcul es va realitzar amb la següent fórmula:

$$OD\ finals = OD\ inicials * 2^{\frac{Temps}{Temps\ de\ duplicació}}$$

A continuació, es realitzen dos exemples de càlcul per diferents temps de duplicació:

$$0,65 = OD\ inicials * 2^{\frac{15\ hores}{2,5\ hores}} \rightarrow OD\ inicials = 0,010\ OD$$

$$0,65 = OD\ inicials * 2^{\frac{15\ hores}{5\ hores}} \rightarrow OD\ inicials = 0,081\ OD$$

Es va mesurar la concentració als precultius i es van inocular les quantitats calculades, es van incubar *overnight* a 30°C i 180 rpm d'agitació i es van mesurar les OD assolides a

primera hora del dia següent. Això és de vital importància perquè en cas de que les cèl·lules s'haguessin dividit més ràpid de lo esperat es podrien haver diluït els cultius i reiniciar el creixement.

Degut a que es volien fer fotografies en dos canals diferents (*Bright Field* i Fluorescència GFP) les cèl·lules havien d'estar fixades al cobreobjectes. Per a fixar les cèl·lules es va fer servir concanavalina A. Es van posar 10 µl de concanavalina A sobre el cobreobjectes i es va deixar un mínim de 30 min. Per a evitar que la solució de concanavalina A s'eixugués es va realitzar aquesta incubació dins d'una caixa de puntes buida a la que se li havia afegit prèviament aigua MQ al fons. Passats els 30 min es va aspirar la solució de concanavalina A, amb compte de no tocar el cobreobjectes, i es van realitzar dos rentats amb aigua MQ. Es va realitzar un tercer rentat amb el medi en el que s'estaven creixent les cèl·lules i un cop aspirat es van afegir 10 µl de medi amb cèl·lules. Es va incubar durant 5-7 min per a que els llevats s'enganxessin a la concanavalina A i es va realitzar un rentat amb el medi en que havien crescut les cèl·lules per a descartar aquelles que no s'hagin enganxat. Es va col·locar el cobreobjectes sobre un portaobjectes i es van portar les mostres a microscopia. En els casos en que hi havia moltes mostres, es va baixar amb la caixa de puntes amb aigua per evitar que s'eixuguin.

El microscopi que es va utilitzar va ser un *Leica AF6500 Automated Widefield* amb l'objectiu de 63x Oil HCX PL S-APO. El làser utilitzat va ser un *SOLA Light Engine* d'excitació de fase sòlida de llum Led blanca. El filtre de fluorescència utilitzat va ser el *EGFP Selective*, amb un filtre d'excitació BP482/18, un mirall dicroic de 495 nm i un filtre d'emissió de BP520/28 per a mesurar GFP. El valor màxim de fluorescència detectable pel microscopi és de 65535 unitats arbitràries pel que valors superiors es troben en saturació i no són quantificables.

El software utilitzat per al control del microscopi va ser el *LAS X Life Science*. En primer lloc, es van escollir els canals en el que es volia observar la mostra, en aquest cas van ser *Bright Field* i Fluorescència per a GFP. A continuació, es va seleccionar l'objectiu a fer servir, es van enfocar les cèl·lules i es va ajustar la quantitat de llum blanca per a que s'observin correctament en *Bright field*. Es va procedir a configurar la fluorescència amb la mostra que suposàvem que tenia la major intensitat per evitar la saturació del canal.

Es va ajustar el temps d'exposició de les imatges i el *gain* per a que les cèl·lules que brillaven es diferenciessin el màxim possible del *background* sense arribar a la saturació. És necessari que totes les mostres es mesurin amb el mateix temps d'exposició i el mateix *gain* per a poder realitzar la posterior quantificació. Es va procedir a la captura de les imatges.

Test de viabilitat

El dia anterior a la realització del test de viabilitat es van inocular els clons a estudiar en la primera columna d'una placa de 96 pous amb medi YPD i es van deixar créixer a 30 °C fins a saturar *overnight*. Al dia següent es van realitzar dilucions successives 1/100 de cada pou en diferents columnes amb YPD. Es va centrifugar la placa a 2500 rpm, es va descartar el sobrenedant i es van resuspendre les cèl·lules en *phosphate saline buffer* (PBS). En aquest pas es va eliminar tot el medi YPD possible per tal de que no afectés quan es van passar les cèl·lules a plaques amb altres medis. Es van preparar plaques amb YPD i YPGal ja que es volia estudiar el creixement en glucosa i en galactosa. Es va introduir el replicador de 8x8 (*Pin Replicator*) en els pous de la placa de 96 que contenien les dilucions seriades i es va col·locar sobre la placa d'agar. Es van esperar 2 min a que caigués tot el volum que havia adherit als *pins* i es va procedir a la seva esterilització per flama. Es van incubar les plaques entre 24 i 48 h a 30°C i es van realitzar les fotografies corresponents. En aquest cas, per motius de disponibilitat, es van realitzar les fotografies en un lector de gels d'agarosa.

Extracció de proteïna de *S. cerevisiae*

Es van cultivar els llevats en 10 ml de YPD a 30°C i 180 rpm d'agitació *overnight*. Al dia següent es van agafar 5 OD del cultiu i es van centrifugar a 5000 rpm durant 3 min. Es va descartar el sobrenedant i es va resuspendre el pellet en 1 ml d'aigua MQ a 4°C. Es van centrifugar les cèl·lules a 10000 rpm durant un min, es va descartar el sobrenedant i es va posar el pellet en un termobloc a 95°C durant 2 min. Es van afegir 15 µl d'urea 5 M i uns 20 µl de *glass beads*. Es van llisar les cèl·lules en el *FastPrep* durant 30 s a velocitat 6 m/s. Es van afegir 50 µl de SR 1x i es van vortexar durant 5 s. Es van tornar a col·locar al termobloc a 95°C durant 2 min. Es van centrifugar 5 min a 13000 rpm i es van recollir 50 µl del sobrenedant transferint-lo a un tub net. Es van afegir 50 µl de SSR

2x. Prèviament s'havien preparat els *buffers* SR 1x i SSR 2x a partir d'estocs de SS i SR. El *buffer* SS es va preparar en un estoc de 4x en el que hi havia 20 % de sucrosa i 0,02% de blau de bromofenol en aigua MQ. El *buffer* SR es va preparar en un estoc de 4x en el que hi havia un 8% de SDS en 0,5M Tris-HCl a pH 6,8. El *buffer* SSR 2x es va preparar afegint un volum de *buffer* SS 4x, un volum de SR 4x i β -mercaptoetanol amb una concentració final del 2%.

Western Blot

La quantitat d'acrilamida del gel variarà en funció de la mida de la proteïna d'interès. Es van preparar els vidres rentant-los amb etanol 70% i eixugant-los amb paper. Es va fer el sandvitx amb els dos vidres i es va col·locar en la pinça.

La fusió de GAL4 amb hAB42 i FLAG té un pes molecular aproximat de 120 kDa pel que es va preparar un gel al 7,5%.

Taula 2: Quantitats necessàries dels diferents reactius que calen per a preparar un running gel a diferents concentracions d'acrilamida.

Components	Percentatge d'acrilamida del <i>running gel</i>				
	6%	7,5%	10%	12%	15%
	Quantitat a afegir per gel				
40% Acrilamida (ml)	0,75	0,94	1,25	1,5	1,875
1M Tris HCl pH 8,8 (ml)	1,875	1,875	1,875	1,875	1,875
H ₂ O MQ (ml)	2,28	2,09	1,78	1,53	1,155
10% SDS (μ l)	50	50	50	50	50
10% Persulfat amònic (μ l)	40	40	40	40	40
TMED (μ l)	5	5	5	5	5

Es va preparar en un tub de 50 ml el *mix* segons l'especificat a la Taula 2. La tetrametiletildiamina (TMED) va ser l'últim component afegit ja que un cop s'addiciona s'inicia la polimerització. Un cop afegit es va transvasar la mescla a l'espai entre els dos cristalls amb una pipeta de 1000 μ l deixant suficient espai per a afegir el *stacking gel*. Mentre es preparava el *stacking gel* i solidificava el *running* es va cobrir la superfície del *running gel* amb isopropanol. L'*stacking gel* es va preparar a una concentració del 5% en acrilamida.

Taula 3: Quantitats dels diferents reactius que calen per a preparar un stacking gel.

Percentatge d'acrilamida del <i>stacking</i> gel: 5%	
Components	Quantitat a afegir per gel
40% Acrilamida (ml)	0,312
1 M Tris-HCl pH 6,8 (ml)	0,312
H ₂ O MQ (ml)	1,83
10% SDS (µl)	25
10% Persulfat amònic (µl)	17
TEMED (µl)	2

Es va retirar l'isopropanol de sobre del *running* gel i es va rentar la superfície 5 cops amb aigua MQ. Es va afegir la barreja del *stacking gel*, es va col·locar la pinta i es va deixar polimeritzar durant 20 min.

Es van incubar les mostres a 95°C durant 2 min i es van col·locar els gels dins de la cubeta amb *running buffer* (25 mM de Tris, 190 mM de glicina i 0,1% de SDS). Es va retirar la pinta i es van netejar els pous amb *running buffer* de manera que no quedessin fragments de gel. Es van carregar 10 µl de mostra en els pous i es van córrer els gels 20 mA per gel durant 1,5 h.

La transferència que es va realitzar és del tipus semi-seca. Es va preparar el *buffer* de transferència (25 mM de tris, 190 mM de glicina i 20% de metanol) i es va incubar el gel amb aquest *buffer* durant 15 min per a equilibrar-lo. Es va activar la membrana de cel·lulosa humitejant-la en *buffer* de transferència amb metanol 10% durant 2 min. Es va col·locar el gel sobre la membrana i entre dos esponges de transferència i es va realitzar la transferència a 15V durant 1 h. Un cop acabada es va tenyir el gel amb blau de *Coomassie* per a comprovar que la transferència havia sigut exitosa i no quedava proteïna en el gel. Es va deixar eixugar la membrana *overnight* i es va preparar la llet per a fer el bloqueig al dia següent. Es van dissoldre 5 grams de llet en pols en 100 ml de PBS amb 0,1% de Tween (PBS-T). Al dia següent, es va deixar bloquejant la membrana durant 1 h amb agitació suau. Es van realitzar tres rentats de la membrana amb PBS-T durant 15, 10 i 5 min respectivament i es va incubar la membrana amb una dilució 1:1000 de l'anticòs primari en PBS-T/Llet 5% durant 1 h. L'anticòs primari utilitzat va ser el

Monoclonal Anti-FLAG M2 Antibody produït en ratolí adquirit a *Sigma-Aldrich* (Cat: F3165-2). Es van realitzar tres rentats de 5 min en PBS-T i es va procedir a una incubació de 45 min amb una dilució 1:10000 de l'anticòs secundari en PBS-T/Llet 5%. L'anticòs secundari utilitzat va ser el *Amersham ECL Mouse IgG, HRP-linked whole Ab* produït en ovella de *GE Biosciences* (Cat: NA931). A continuació, es van realitzar tres rentats de 15, 10 i 5 min respectivament amb PBS-T i es va incubar, en la foscor, la membrana amb 1 ml de solució reveladora *Clarity™ Western ECL Substrate* (Cat: 1705061) (0,5 ml de *Clarity Western Peroxide Reagent* i 0,5 ml de *Clarity Western Luminol/Enhancer Reagent*). Es va posar la membrana en un *casette* i es va revelar amb film de rajos X a la cambra fosca.

Estadística

Per al tractament de dades es van utilitzar Microsoft Excel i GraphPad Prism v.7.0a. Per a l'obtenció de dades de la fluorescència es va utilitzar el *plugin* BudJ desenvolupat per Martí Aldea.

Resultats

Eliminació de yeGFP de pYM44-PFD i addició de FLAG

Es van seleccionar quatre PFDs que podrien resultar d'interès estudiar: sPFD, cPFD, β -amiloides i α -sinucleïna. sPFD és un prió sintètic construït a partir d'un algorisme que pren com a base els prions identificats per Alberti et al.. Per contra, cPFD és un control negatiu sintètic de l'agregació (Toombs et al., 2012). El plasmidi seleccionat per a realitzar la construcció va ser pYM44 que conté el marcador de selecció HIS3MX6 i un patró per a fusionar, mitjançant PCR, *yeast enhanced GFP* (yeGFP) a l'extrem C-terminal d'una proteïna d'interès. Prèviament, s'havien construït els diferents plasmidis que contenien els quatre PFDs, anomenats: pYM44-sPFD-yeGFP, pYM44-cPFD-yeGFP, pYM44-hSNCA-yeGFP i pYM44-hA β 42-yeGFP.

Donat a que en el mètode proposat no hi pot haver un yeGFP després del PFD es van dissenyar uns *primers* per a realitzar un *Exsite*. Aquest mètode consisteix en dissenyar un *primer forward* que s'alineï just després just després del codó de STOP de yeGFP i que inclogui una diana de restricció per a *XhoI*. El *primer reverse* es dissenya de manera

que alineï just després de la seqüència de PFD i que contingui una cua que codifiqui per a FLAG i un lloc de restricció per a *XhoI*. De manera que quedi a l'extrem C-terminal del PFD fusionat FLAG. FLAG és un pèptid de vuit aminoàcids (DYKDDDDK) pel que hi ha dissenyats anticossos d'alta afinitat de manera que és útil per a la posterior purificació o detecció de la proteïna al que estigui fusionat. També s'ha afegit una seqüència de 4 nucleòtids posterior a la diana de *XhoI* per tal de que aquest enzim pugui realitzar la seva funció de manera òptima. Els primers que es van utilitzar són 2174-O i 2175-O (Taula suplementària 1).

Per a la PCR es va fer servir la polimerasa *Phusion* ja que el fragment a amplificar és de 4kb i es vol evitar en la major mesura possible possibles errors. Un cop realitzada la PCR s'obté un producte lineal que no codifica per a yeGFP, conté FLAG fusionat a PFD i dianes de restricció per a *XhoI* en ambdós extrems. Els resultats esperats d'aquesta PCR es troben detallats a la Taula 4.

Taula 4: Construccions obtingudes resultat del Exsite i mida esperada dels fragments obtinguts (pb). Les dianes de restricció es troben representades amb el nom de l'enzim corresponent (XhoI).

Construcció obtinguda	Parells de bases (pb)
XhoI+pYM44+cPFD+FLAG+XhoI	4407
XhoI+pYM44+sPFD+FLAG+XhoI	4407
XhoI+pYM44+hAB42+FLAG+XhoI	4485
XhoI+pYM44+hSNCA+FLAG+XhoI	4194

A continuació, es va carregar una alíquota del producte de les diferents PCRs i els plasmidis de partida en un gel d'agarosa al 0,8% juntament amb un marcador de pes molecular d'1 kb. A la Figura 4, s'observen que les bandes obtingudes en les PCRs es corresponen amb les mides esperades (Taula 4). En el carril de la mostra pYM44-sPFD-yeGFP no presenta banda probablement per un error de càrrega o per una concentració de plasmidi molt petita.

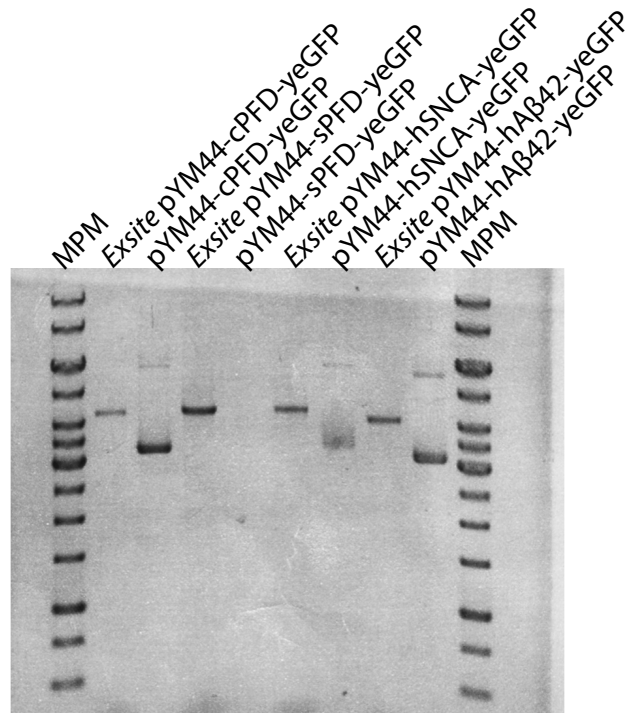


Figura 4: Resultat del gel d'agarosa en el que hi ha els productes de PCR (Exsite) i els plasmidis originals. En el primer i últim carril hi ha el marcador de pes molecular (MPM d'una kilobase).

A continuació, es va realitzar un *clean up*, per tal d'obtenir el DNA amb la màxima puresa possible. Un cop realitzat el *clean up* es va procedir a realitzar una digestió doble amb *XhoI* i *DpnI*. *DpnI* és un enzim que només és capaç de digerir DNA que es trobi hemimetilat o metilat i que, per tant, no és procedent d'un producte de PCR. D'aquesta manera s'aconsegueix eliminar el plasmidi motlle. La digestió amb *XhoI* es realitza per a generar extrems cohesius de manera que es pugui realitzar una posterior lligació. Es va realitzar un *clean up* per a evitar restriccions inespecífiques. Es va realitzar la lligació fent servir la ligasa T4 i una posterior transformació en la soca competent DH5α d'*E. coli*. Es va realitzar la selecció utilitzant ampicil·lina.

Es va realitzar una purificació dels plasmidi i es va mesurar la concentració i la puresa del DNA obtingut mitjançant espectrofotometria en un *NanoDrop*. Per a diagnosticar si els plasmidis havien incorporat el prió es van dissenyar una sèrie de dobles digestions que donessin com a resultat diferents mides de banda identificables en un gel d'agarosa. Es va intentar que una de les dianes estigues en el PFD, però en alguns casos no va ser

possible degut a la limitada quantitat d'enzims de restricció que presentessin una sola diana o dues (Taula 5).

Taula 5: Mides de banda esperades resultants de les diferents restriccions per a validar els plasmidis.

Plasmidi	Enzims utilitzats	Fragments esperats (pb)
pYM44-cPFD-FLAG	<i>NotI</i>	1999 + 2390
pYM44-sPFD-FLAG	<i>HindIII + XbaI</i>	1426 + 2963
pYM44-hSNCA -FLAG	<i>XhoI + XbaI</i>	1011 + 3456
pYM44-hA β 42-FLAG	<i>EcoRV + HindIII</i>	1749 + 2427

Paral·lelament, també es van digerir tots els plasmidis amb *XhoI* per a comprovar que la banda aparegués a la mida esperada de la forma lineal. Com a control negatiu de la digestió es va realitzar el mateix procediment que en les restriccions però sense afegir enzims de restricció. Es van carregar les mostres en un gel d'agarosa al 0,8% i el resultat va ser l'observat a la Figura 5.

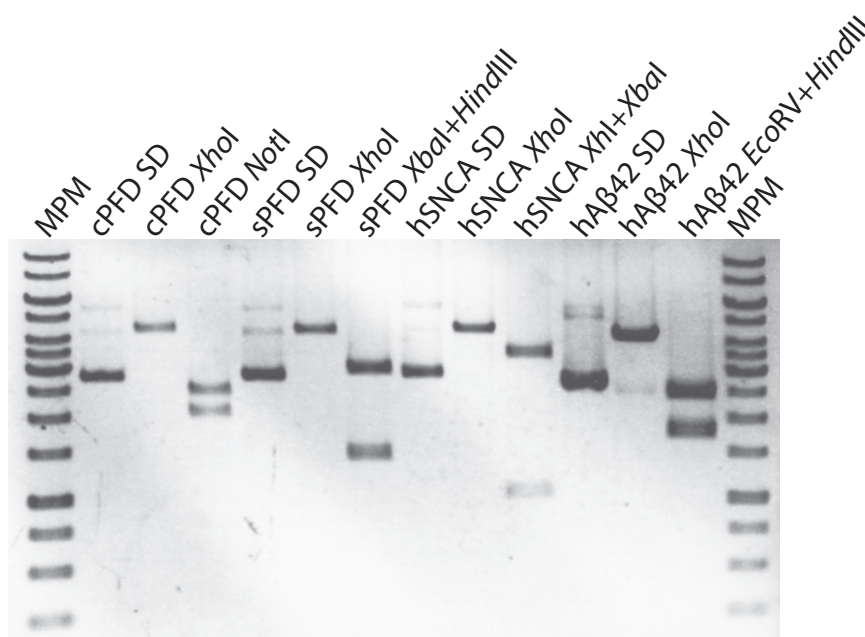


Figura 5: Resultat de l'electroforesi en el que hi ha els plasmidis sense digerir (SD) o digerits amb els enzims indicats, en ambdós extrems hi ha el marcador de pes molecular (MPM) d'una Kilobase.

Els fragments obtinguts es corresponen amb els esperats de les digestions (Taula 5) pel que s'ha aconseguit l'objectiu d'aïllar els PFDs en un plasmidi. En els carrils on es van carregar els plasmidis sense digerir s'observen les tres formes que presenten els

plasmidis: linear, *nicked* i circular. Les formes linear i *nicked* tenen molta menor concentració degut a que són resultat de trencaments per la manipulació. En alguns carrils s'observa una banda de molt menor intensitat que seria corresponent a la forma *supercoiled*. Les bandes observades en les digestions simples i en les digestions dobles es corresponen a les esperades.

Efectes de la transformació amb PFDs en el creixement

En un experiment previ, s'havia transformat la soca W303-1A amb un plasmidi que contenia els PFDs sota control de *Gal4p*. A l'induir l'expressió del pèptid en un medi amb galactosa i deficient en glucosa, s'havia observat que aquelles soques que contenien hA β 42 i sPFD tenien un creixement retardat o pràcticament inexistent. Per contra, aquelles soques transformades amb cPFD i hSNCA tenien un creixement comparable amb el *wild type*. En medis amb glucosa també s'observava un menor creixement de les soques transformades amb hA β 42 i sPFD, tot i que molt menys accentuat que en el medi amb galactosa. Per estudiar les diferències de creixement es va realitzar un test de viabilitat (Figura 6).

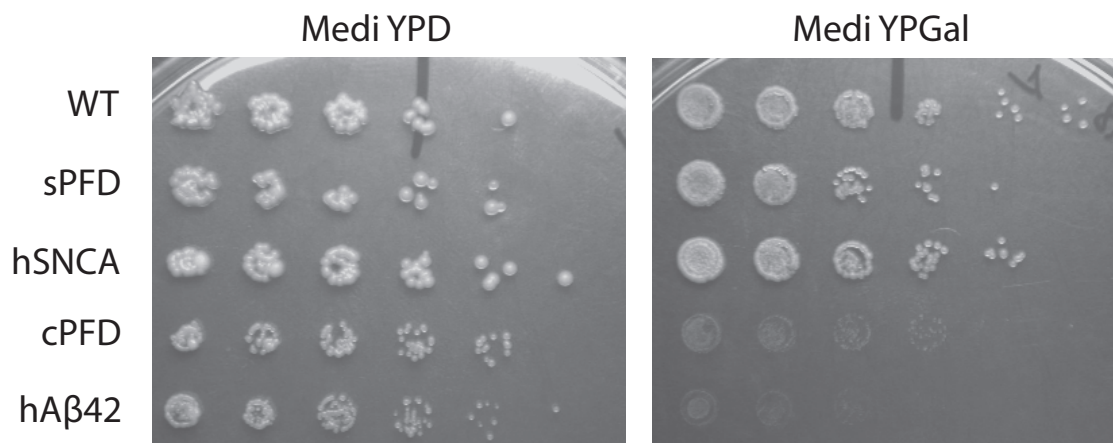


Figura 6: Test de viabilitat de les diferents soques transformants en un medi amb glucosa (YPD) i medi amb galactosa (YPGal).

Tal i com veiem en la imatge, no només és menor el nombre de colònies d'hA β 42 i sPFD en el medi YPD sinó també la seva mida. Així doncs, no només el nombre de colònies viables és menor sinó que la seva capacitat de proliferació també es troba disminuïda. Es creu que existeix una expressió mínima constitutiva de GAL4 en presència de glucosa

i és això el que podria ser el causant de l'expressió de PFD sota el control de *GAL4p* que donaria lloc a agregats. Es troba àmpliament descrit en la bibliografia que la presència d'agregats pot resultar en la letalitat o en un alentiment del creixement (Bagriantsev and Liebman, 2006). Com era d'esperar, cPFD no provoca un retard en el creixement degut a que no agrega. En medi YPGal es veuen problemes de creixement més accentuats en que en YPD. Els llevats transformats amb hSNCA presenten un creixement comparable amb el del *wild type* pel que es creu que l'hSNCA no agrega. Això és un fet plausible, ja que el mecanisme d'agregació d'aquesta proteïna és més complex i implica modificacions post-traduccionals.

Creació d'una forma d'hA β 42 que no agrega

Per a avaluar si l'efecte observat es deu a l'agregació o a A β *per se*, es va dissenyar un experiment en el que el PFD de la construcció és una forma mutada de A β que no agrega. Per a saber quines mutacions calia realitzar per evitar l'agregació es va consultar la bibliografia i es van escollir les següents: I32T, M35T, V39A i I41N (Bagriantsev and Liebman, 2006; Wurth et al., 2002).

Partint d'aquesta base es van dissenyar *primers* per a amplificar el plasmidi pYM44-hA β 42-FLAG i per a introduir les mutacions desitjades. Idealment, alguna d'aquestes mutacions hagués pogut crear una diana de restricció que permetés realitzar una posterior comprovació de si les mutacions s'havien realitzat correctament. Després d'analitzar el plasmidi amb *SnapGene* i veure que no hi havia cap diana amb els enzims disponibles al laboratori, es va decidir incloure una mutació extra que creés aquesta diana de restricció. Per tal de no modificar el pèptid més del necessari es va buscar una mutació que fos silenciosa. Per a la creació de la diana de restricció silenciosa es va fer servir el software *Silent ORF Mutagenesis d'Insilicase*. Els canvis de codons (indicats amb un subratllat) es van escollir intentant realitzar el mínim nombre de canvis de bases i tenint en compte el *codon usage* de *S. cerevisiae*. L'ús de l'enzim *NarI* permetia obtenir una sola diana de restricció i que només fos necessari realitzar un canvi de base, fet que facilita l'*annealing* dels *primers*.

La seqüència original del plasmidi era:

```
...ATGGATGCAGAGTTCCGACATGACTCAGGATATGAAGTTCATCATCAAAAATTGGTGTTCCTTGCAG  
AAGATGTGGGTTCAAAACAAAGGTGCAATCATTGGACTCATGGTGGGCGGTGTTGTCATAGCGGGTGGATC  
TGGTTCGGCTCT...
```

La seqüència desitjada era:

```
...ATGGATGCAGAGTTCCGACATGACTCAGGATATGAAGTTCATCATCAAAAATTGGTGTTCCTTGCAG  
AAGATGTGGGTTCAAAACAAAGGTGCAATCACTGACTCACCGTGGGCGGCGCCGTCAATGCGGGTGGATC  
TGGTTCGGCTCT...
```

A continuació, es van dissenyar els *primers* que permetessin introduir aquestes mutacions i que es trobessin fosforilats en 5' per a poder realitzar una posterior lligació. Per a assegurar-nos de que els *primers* hibridin de manera específica es va considerar necessari que hi haguessin un mínim de 15 bases després de l'últim *missmatch*. Els *primers* utilitzats van ser 2307-O i 2308-O (Taula suplementària 1).

Donat a que l'amplicó era el plasmidi sencer pYM44-hA β 42-FLAG (4176 pb) i es volia que la polimerasa cometés el menor nombre d'errors possibles es va fer servir la *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* ja que comet 50 vegades menys errors que la *Taq Polymerase*.

Un cop realitzada la PCR, es va realitzar una electroforesi en un gel del 0,8% en agarosa carregant 1,5 μ l de la mostra (Figura 7). Mitjançant l'addició d'un *ladder* d'1KB que té unes bandes de concentració coneguda es va poder fer una aproximació de la quantitat de producte de PCR.

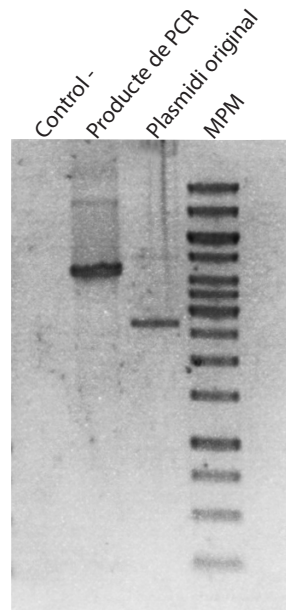


Figura 7: Resultat de l'electroforesi en la que s'ha carregat el producte de la PCR per introduir mutacions en $hA\beta42$, $pYM44-hA\beta42-FLAG$ (Plasmidi original), un control negatiu de la PCR i el marcador de pes molecular (MPM) d'una Kilobase.

Seguidament, es va realitzar una digestió amb *DpnI*. Acabada la digestió, es va realitzar un *clean up* per eliminar l'enzim de la mostra i obtenir el DNA pur. Es va realitzar una electroforesi en la que es va carregar el plasmidi original, el plasmidi digerit i el *ladder*. El plasmidi original té 22 dianes de restricció per a *DpnI* i genera fragments bastant petits pel que no s'aprecia cap banda en el gel, per contra en el carril on s'ha carregat el producte de PCR digerit s'aprecia una banda entre 4000 i 5000 pb (Figura 8).

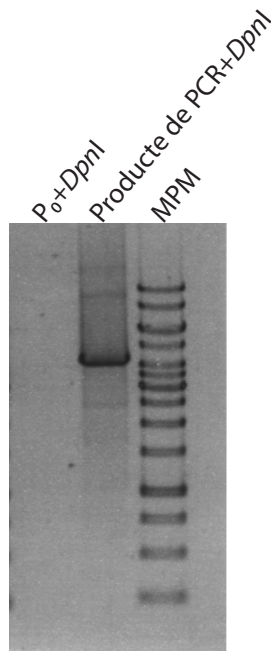


Figura 8: Resultat d'una electroforesi on s'ha digerit pYM44-hA β 42-FLAG i el producte de la PCR per introduir mutacions a hA β 42. A la dreta del tot s'observa el marcador de pes molecular (MPM) d'una Kilobase.

Seguidament, es va procedir a la lligació del producte de PCR per a formar un plasmidi (pYM44-hA β 42m-FLAG) amb la T4 ligasa. Es va comprovar l'efectivitat de la lligació mitjançant una electroforesi. El DNA circular presenta una estructura tridimensional més compacta que la forma lineal, pel que el plasmidi lligat migrarà més ràpidament a través del gel que la forma sense lligar tot i tenir el mateix nombre de bases. Tenint en compte que pYM44-hA β 42-FLAG i pYM44-hA β 42m-FLAG tenen el mateix nombre de bases, en cas que la lligació hagi segut efectiva hauria d'aparèixer una banda entre 2500 i 3000 parells de bases. Malgrat repetir diverses vegades aquest procediment no es va aconseguir obtenir la banda desitjada. Es va pensar que la quantitat de DNA lligat no era suficientment gran per a observar una banda clara i per això es va procedir a la transformació en *E. coli* DH5 α i es van sembrar en plaques LB amb ampicil·lina. A les 24 h i a les 48 h no havia crescut cap colònia en les plaques. Es va suposar que la lligació no funcionava correctament. Es va realitzar una nova lligació amb un pas previ d'inactivació de les fosfatases presents a la mostra amb una incubació de 5 min a 92°C, però tampoc es van aconseguir colònies transformants.

Es va voler realitzar un control de la lligació, pel que es va buscar un enzim que tallés un sol cop pYM44-hA β 42-FLAG. Es va realitzar la restricció amb *EcoRV* i la posterior

relligació amb la T4 ligasa. Es van transformar *E. coli* DH5 α amb pYM44-hA β -FLAG, pYM44-hA β 42-FLAG tallat amb *EcoRV*, pYM44-hA β 42-FLAG tallat amb *EcoRV* i lligat amb T4, pYM44-hA β 42m-FLAG digerit amb *DpnI* i relligat amb T4 i el producte de PCR pYM44-hA β 42m-FLAG. La placa on hi havia cèl·lules transformades amb pYM44-hA β 42-FLAG tenia més de 100 colònies i la que tenia cèl·lules transformades amb pYM44-hA β 42-FLAG digerit amb *EcoRV* i relligat amb T4 tenia una colònia. D'aquest resultat es dedueix que la lligació està essent el pas limitant.

Es va repetir el procés de lligació amb la incubació *overnight*, a menor temperatura i en 15% de PEG que és el que recomana la casa comercial per a millorar l'eficiència. Un cop realitzada es va realitzar una electroforesi però tampoc es va observar la banda desitjada. Tot i així, es va realitzar la transformació i al cap de 24 h havien crescut 28 colònies. Es van plaquejar en altres plaques amb ampicil·lina 6 colònies diferents i es van deixar créixer per a realitzar una posterior purificació del plasmidi. Un cop realitzada la purificació del plasmidi es va procedir a mesurar la quantitat de DNA obtingut i la seva puresa al *NanoDrop* (Taula 6).

Taula 6: Concentració i puresa de DNA (ràtio 260/289) de diferents colònies que contenen pYM44-hA β 42m-FLAG.

Mostra	Concentració (ng/ μ l)	A260/280
pYM44-hA β 42m-FLAG (1)	160,7	1,911
pYM44-hA β 42m-FLAG (2)	48,2	1,733
pYM44-hA β 42m-FLAG (3)	41,3	1,864
pYM44-hA β 42m-FLAG (4)	54,5	1,847
pYM44-hA β 42m-FLAG (5)	75,5	1,882
pYM44-hA β 42m-FLAG (6)	48,0	1,981

Es va realitzar una digestió amb *NarI* per tal de comprovar que els plasmidis aïllats continguessin la mutació silenciosa i, suposadament, totes les desitjades. Un cop realitzada la digestió es va realitzar una electroforesi per a determinar quins plasmidis havien sigut tallats (Figura 9).

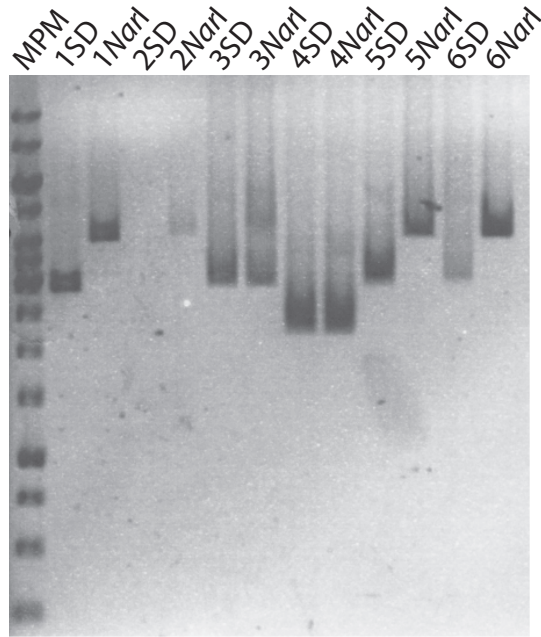


Figura 9: Resultat de l'electroforesi en la que s'han carregat les mostres de DNA obtingudes de l'extracció de plasmidis de 6 colònies diferents i que han sigut sotmeses a una digestió amb *NarI*. També s'han carregat mostres sense digerir (SD) per a comprovar la diferència en l'alçada de la banda. A l'esquerra es troba el marcador de pes molecular (MPM) d'una kilobase.

Tal i com es veu a la Figura 9, els clons 1, 5 i 6 presenten fragments de banda diferents degut a que són digerits per *NarI* i per tant són els clons que hauran incorporat les mutacions desitjades. El clon 4 presenta unes bandes de menor pes molecular pel que es creu que hi ha una contaminació.

Transformació de *hAβ42* i *hAβ42m* al genoma de *S. cerevisiae*

Es van dissenyar uns *primers* per a amplificar el PFD i FLAG juntament amb HIS3MX6 i que afegissin unes cues que permetessin una recombinació homòloga a l'extrem 3' de *Gal4*. Els *primers* dissenyats van ser 1679-O i 2203-O (Taula suplementària 1).

Un cop realitzada la PCR, amb el DNA de partida de pYM44-hAβ42-FLAG i pYM44-hAβ42m-FLAG, es va carregar part del producte en un gel d'agarosa i es va realitzar una electroforesi (Figura 10).

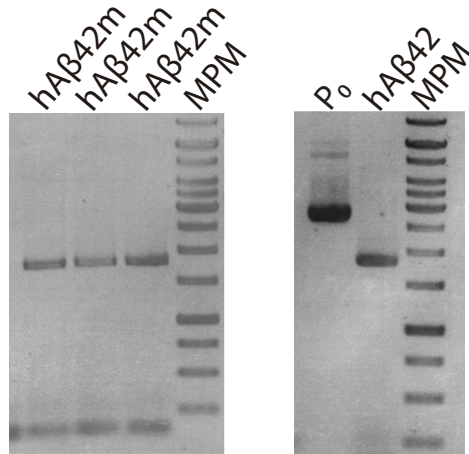


Figura 10: Resultat de l'electroforesi dels productes de la PCR per a la addició de cues que permetin la recombinació downstream de Gal4. Es presenten 3 hAβ42m ja que provenen de diferents colònies resultants de la transformació. Les electroforesis es van realitzar en dos dies diferents i per això no apareixen en un mateix gel. També es va carregar pYM44-hAβ42-FLAG (P₀) i un marcador de pes molecular (MPM) d'una kilobase.

Es va realitzar un *clean up* i es va procedir a la transformació en W303-1A. Els llevats transformats es van sembrar en plaques sense histidina ja que es volia realitzar una selecció positiva d'auxotròfia per histidina. Es van seleccionar 26 colònies de pYM44-hAβ42-FLAG i 22 colònies de pYM44-hAβ42m-FLAG i es van replaquejar en plaques d'auxotròfia per histidina.

Es va realitzar una *colony PCR* d'algunes colònies per a comprovar la recombinació del producte de PCR downstream del gen de *gal4*. Els primers utilitzats són 1135-O i 1681-O (Taula suplementària 1). El primer 1135-O alinea amb el DNA que provenia originalment del plasmidi mentre que el primer 1681-O alinea amb una regió de DNA genòmic al locus de *gal4*. D'aquesta manera, l'amplificació es produeix només en el cas de que el DNA del plasmidi hagi sigut inserit en *gal4*, i la mida de la banda serà indicatiu de si s'ha inserit tot el DNA d'interès o la recombinació ha estat només parcial. Es va carregar el producte d'aquesta PCR en un gel d'electroforesi (Figura 11) en el que es va veure que 7 colònies presentaven la inserció d'hAβ42 al locus de GAL4 i 5 colònies presentaven la inserció d'hAβ42m.

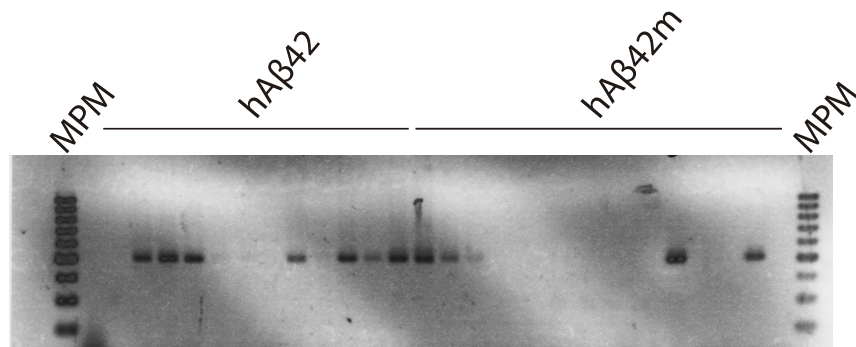


Figura 11: Resultat de l'electroforesi en el que es van carregar els productes de la Colony PCR per a comprovar la recombinació de *hAβ42* i *hAβ42m* downstream del gen de *Gal4*. A ambdós extrems es pot observar el marcador de pes molecular (MPM) d'una kilobase.

Seguidament, es va realitzar una extracció de DNA genòmic de dues colònies transformades amb *hAβ42-FLAG* i dues colònies *hAβ42m-FLAG*. A partir d'aquest DNA es va realitzar una PCR amb els següents primers 2251-O i 1681-O (Taula suplementària 1). La polimerasa que es va fer servir va ser la *Phusion* ja que l'objectiu d'aquesta PCR era seqüenciar la inserció i zones *upstream* i *downstream* de la recombinació que s'haguessin pogut veure afectades. El nombre de cicles va ser el més baix possible per a evitar l'acumulació d'errors.

Es va realitzar una electroforesi per a comprovar la PCR (Figura 12). Seguidament, es va procedir amb un *clean up* i la mesura de la quantitat de DNA. Es va determinar que la quantitat de DNA era suficient per a la seqüenciació (Taula 7).

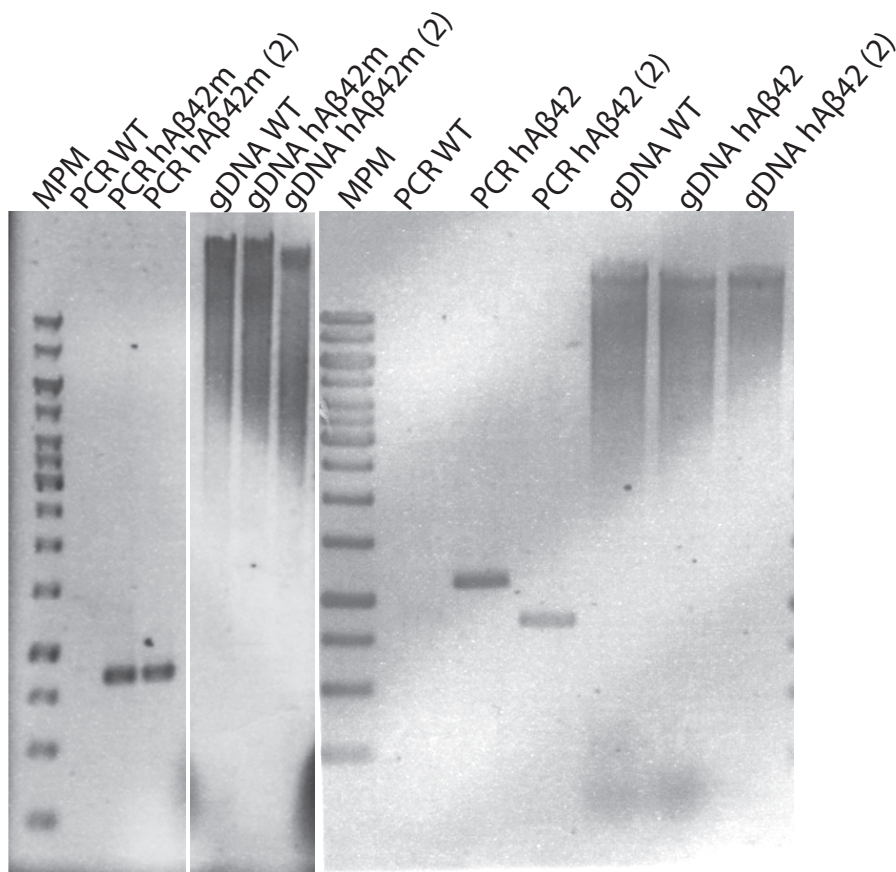


Figura 12: Resultat d'una electroforesi en el que es va carregar el resultat de PCRs per a la seqüenciació de la inserció de hAβ42 i hAβ42m downstream de Gal4. Adicionalment, apareixen el resultats de les extraccions de DNA genòmic (gDNA) i controls negatius (PCR WT). També hi ha el marcador de pes molecular (MPM) d'una kilobase. La imatge es troba fragmentada perquè les PCRs de hAβ42 i hAβ42m es van realitzar en dies diferents i per a eliminar altres mostres carregades no relacionades amb el projecte.

Taula 7: Concentració de DNA del resultat de la PCR per a la posterior seqüenciació.

Soca	Concentració de DNA (ng/μl)
hAβ42	143
hAβ42 (2)	133
hAβ42m	152
hAβ42m (2)	125

Es va externalitzar la seqüenciació amb Eurofins *LIGHTrun* que demanen entre 20-80 ng de DNA en 5 μl i 5 μl d'un dels primers utilitzats en la PCR a concentració 5 μM. Totes les mostres complien aquests requisits. La validesa de la seqüenciació es mesura principalment amb els valors de qualitat *Phred* i aquests valors s'assignen de manera

individual a cada nucleòtid. La majoria de nucleòtids i, en especial, els que contenen la seqüència del gen *hAβ42* i *hAβ42m* tenien puntuacions *Phred* superiors a 50, pel que la probabilitat d'error és de 1 en 100000. En la Figura 13, s'observa un fragment del cromatograma obtingut durant la seqüenciació que correspon a la seqüència de *hAβ42*. Les barres grises indiquen els valors de *Phred* i com s'aprecia, són tots bastant similars.

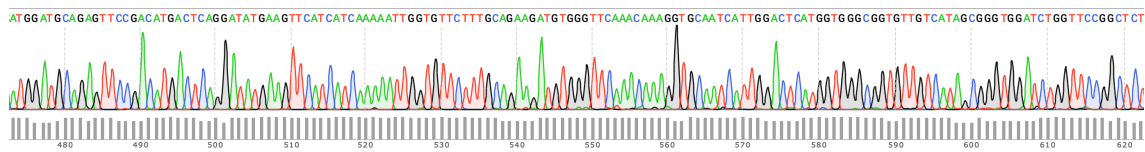


Figura 13: Exemple d'un dels cromatogrames obtinguts en la seqüenciació. En la imatge es mostra la seqüència de *hAβ42* i les puntuacions *Phred* representades amb barres grises.

Es considera que els *Phred* són suficientment bons per a poder determinar si el DNA conté les seqüències desitjades. Es va realitzar un alineament global amb el *software Clustal Omega* de totes les seqüències completes obtingudes de la seqüenciació i es va veure que no hi havia mutacions fora de la zona de *hAβ42*. Es va realitzar un alineament local de la seqüència obtinguda de *hAβ42* i *hAβ42m* i es van comparar amb les seqüències esperades. A continuació, es veu l'alineament d'un fragment de la seqüència *hAβ42* i *hAβ42m* que conté totes les mutacions esperades.

Esperada *hAβ42* ...ATCATTGGACTCATGGTGGGCGGTGTTGTCATAGCGG...

Obtinguda *hAβ42* ...ATCATTGGACTCATGGTGGGCGGTGTTGTCATAGCGG...

Esperada *hAβ42m* ...ATCACTGGACTCACCGTGGGCGGCCCGTCAATGCGG...

Obtinguda *hAβ42m* ...ATCACTGGACTCACCGTGGGCGGCCCGTCAATGCGG...

Adicionalment, el resultat de la seqüenciació de la soca *hAβ42* que presentava una mida de banda diferent es va comparar realitzant un BLAST amb seqüències humanes i de *S. cerevisiae*. El resultat del BLAST indicava que la seqüència era la de *hSNCA* pel que s'havia contaminat la placa d'*hAβ42* amb un dels clons de *hSNCA*.

Efectes de la transformació amb *hA β 42m* en el creixement

Durant la transformació de les soques amb *hA β 42m* es va observar un creixement més ràpid que el de les soques transformades amb *hA β 42* i similar al del WT. Aquesta recuperació del creixement normal era l'esperat al fer servir una forma del pèptid que no agregués. A la Figura 14 s'aprecia el resultat del test de viabilitat realitzat. Es pot observar que els WT i les soques transformades amb *hA β 42m* tenen un creixement similar tant en glucosa com en galactosa, tot i que sembla que el del WT és lleugerament superior. Per contra, el creixement de les soques transformades amb *hA β 42* tenen un menor creixement en glucosa i un creixement pràcticament nul en galactosa. La mida de les colònies de les soques transformades amb *hA β 42m* també és més similar a la del WT que la de les transformades *hA β 42*.

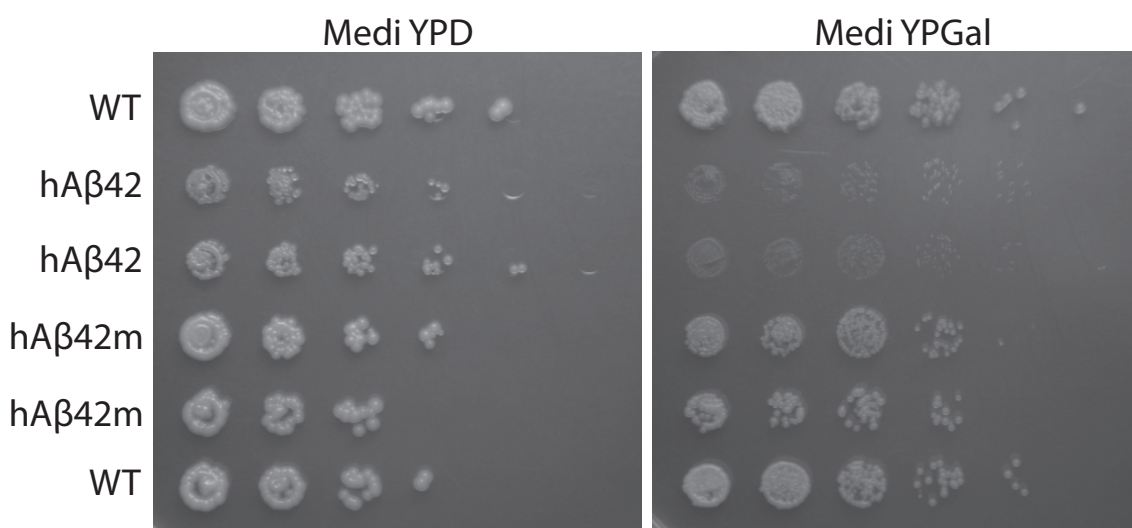


Figura 14: Resultat del test de viabilitat de soques que tenen *hA β 42* i *hA β 42m* inserit downstream de *Gal4*. També es van realitzar de soques WT (W303-1A) com a control positiu del creixement. El test es va realitzar en medi amb glucosa (YPD) i medi amb galactosa (YPGal).

Transformació amb YCplac22, YCpGAL i YcpGFP

Es va realitzar la transformació amb tres plasmidis diferents que permetien una selecció per auxotròfia del triptòfan. YCplac22 es va fer servir com a control de plasmidi buit mentre que YcpGFP es va fer servir com a control positiu de la fluorescència.

Es van realitzar les transformacions de W303-1A, la soca prèviament transformada amb *hA β 42* i *hA β 42m* amb els tres plasmidis esmentats seguint el protocol de transformació.

Es va realitzar la selecció de les soques transformats en plaques amb medi complet sintètic sense triptòfan. A partir d'aleshores, es van mantenir els transformats sempre en aquestes condicions per evitar la pèrdua del plasmidi.

Quantificació indirecta de l'agregació d'hA β 42 i hA β 42m

Un cop transformades les soques es va procedir a la quantificació de la fluorescència emesa per GFP. Es van inocular les soques en medi SC amb galactosa 12 h abans de la quantificació en el microscopi per tal d'activar l'expressió del constructe. La soca W303 transformada amb YcpGFP es va utilitzar com a control positiu de la fluorescència i per a establir els paràmetres de *gain* i exposició per tal d'evitar que hi hagués saturació que impedís la quantificació. Les soques transformades amb YCplac22 es van utilitzar com a control de plasmidi buit mentre que la soca W303 sense transformar va servir com a control negatiu de la fluorescència. Addicionalment, es va quantificar la fluorescència de totes les soques en medi amb glucosa per a descartar l'expressió inespecífica de GFP.

Tal i com es veu en la Figura 15, els controls de plasmidi buit tenen una lleugera fluorescència. Aquest fenomen també succeeix en la soca WT sense transformar pel que es considera que és negligible. La soca WT YCpGAL presenta una intensitat de fluorescència mitjana de 16338 després d'haver restat la fluorescència detectada en cada camp com a soroll de fons. La soca hA β 42 YCpGAL presenta nivells d'intensitat de fluorescència iguals als de els controls del plasmidi buit indicant una incapacitat per a l'expressió de GFP. Aquesta mancança és causada per l'agregació de la fusió GAL4-hA β 42. Per contra, la soca hA β 42m YCpGAL té una intensitat mitjana de fluorescència de 16480, recuperant així el fenotip de la soca WT YCpGAL. Això és indicatiu de que no s'està produint agregació proteica de la fusió GAL4-hA β 42m.

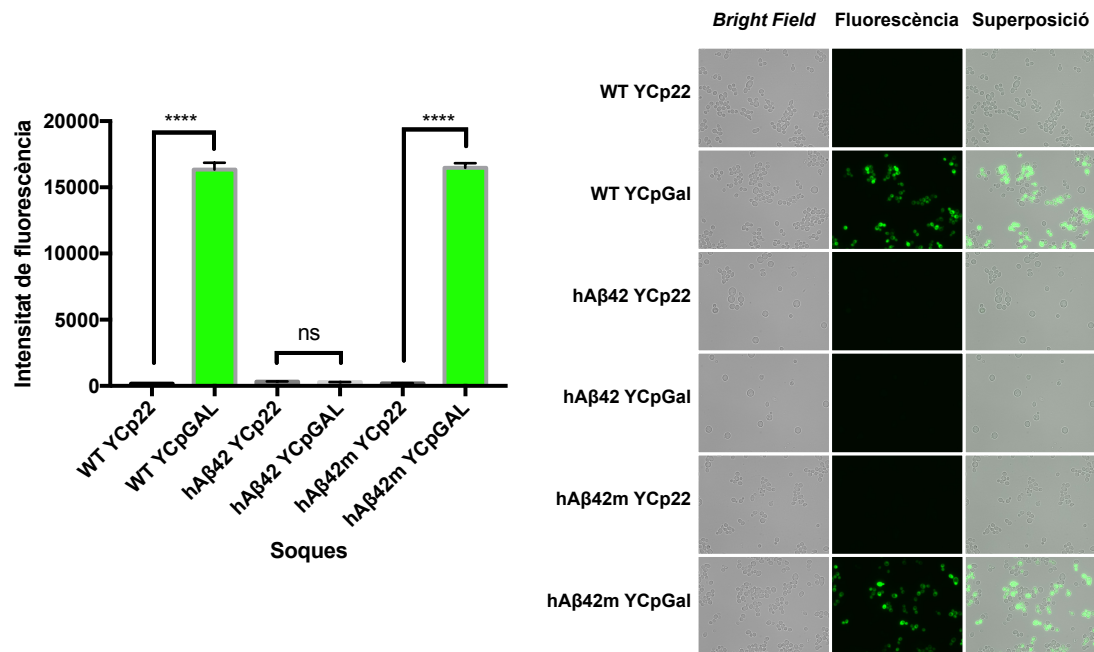


Figura 15: En el gràfic s'observa la intensitat de la fluorescència dels diferents transformants respecte el control de plasmidi buit (**** $p < 0,0001$). La comparació s'ha realitzat amb un T-test i les barres d'error representen la desviació estàndard mostral. A les imatges de la dreta s'observen els diferents clons en Bright Field, fluorescència i les imatges superposades.

A la Figura 15, es veu que no totes les cèl·lules de les soques WT YCpGAL i hAβ42 YCpGAL expressen GFP, el que podria fer pensar un problema en l'activació de gens relacionats amb el creixement en galactosa. Tot i així, la soca WT YCpGFP presentava el mateix patró d'expressió pel que es va atribuir a la presència de cèl·lules mortes o que no es trobaven en cicle cel·lular. GAL4 és un activador de gens del metabolisme i per tant s'expressa molt més en aquelles cèl·lules que requereixen energia, és a dir, les que es troben ciclant o dividint-se. Per acabar de descartar la possibilitat de que no hi hagués una inducció per galactosa prou potent, es va realitzar el mateix experiment tenint les cèl·lules en un precultiu de 24 h amb medi SC_{Raf} trp^- . La rafinosa és un trisacàrid compost per galactosa, glucosa i fructosa que permet una inducció molt més ràpida del metabolisme de la galactosa un cop les cèl·lules es canvien a un medi SC_{Gal} trp^- . No es van veure diferències en el nombre de cèl·lules que expressaven GFP. Així doncs, es va decidir descartar de l'anàlisi aquelles cèl·lules que no sobrepassaven un llindar d'expressió mínim definit per l'ajust a una distribució normal en d'intensitat de fluorescència.

Descartar aquestes cèl·lules no suposa diferències en la comparació entre soques però es va considerar que suposava un millor tractament de les dades.

Diferències en el volum cel·lular

Durant la quantificació d'intensitat de fluorescència es va observar que aquelles soques transformades amb la forma agregativa d'hA β 42 presentaven un volum cel·lular superior pel que es va decidir realitzar una quantificació. A la Figura 16, s'aprecia que la soca hA β 42 YCpGAL té un volum cel·lular de 90,01 μm^3 mentre que les soques WT YCpGAL i hA β 42m YCpGAL tenen volums de 46,09 μm^3 i 39,24 μm^3 ($p < 0,01$) respectivament.

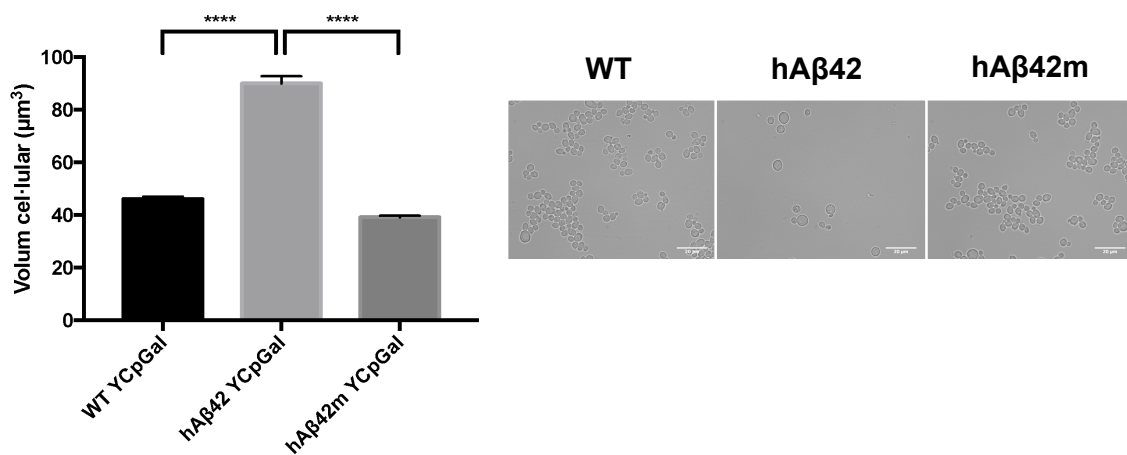


Figura 16: Gràfic en el que es comparen (T-test) els volums cel·lulars dels clons que presenten hA β 42 i hA β 42m amb una soca WT (**** $p < 0,001$). Les barres d'error representen la desviació estàndard mostral. A la dreta imatges de microscòpia en les que s'observen les diferències de superfície cel·lular. L'escala indica una distància de 20 μm .

Quantificació de proteïna hA β 42 i hA β 42m

Es va decidir realitzar una quantificació de l'expressió de les proteïnes hA β 42 i hA β 42m mitjançant Western Blot per a comprovar que no hi havia diferències d'expressió entre les soques. Aquest experiment es va realitzar amb soques crescudes en medi YPD i YPGal per tal d'apreciar diferències d'expressió. Per al marcatge de la proteïna es va utilitzar l'anticòs Anti-FLAG M2.

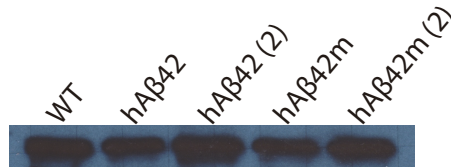


Figura 17: Resultat del Western Blot de l'expressió de hA β 42 i hA β 42m.

Tal i com es veu a la Figura 17, el control negatiu (WT) presenta una banda de la mateixa intensitat que les soques transformades. El mateix passava en les membranes en que s'havien carregat les soques crescudes amb YPGal. Es van revisar altres Western Blots realitzats amb aquesta anticòs i es va observar l'aparició d'aquesta banda en tots. Pel que es conclou que l'anticòs marca una proteïna de manera inespecífica de la mateixa mida que hA β 42 i hA β 42m. Per aquest motiu, no es va poder determinar la concentració de les proteïnes.

Discussió de resultats

L'objectiu d'aquest treball era establir una metodologia per a la identificació de pèptids antiprionics com a possibles tractaments de malalties prioniques i, en especial, la malaltia d'Alzheimer.

Com s'ha mencionat anteriorment, els prions són proteïnes malplegades que segresten altres proteïnes transmetent el mal-plegament. La identificació de compostos que siguin capaços de interferir en aquesta transmissió i, per tant, el desenvolupament de la malaltia, és de vital importància per a desenvolupar tractaments. Partint d'aquesta premissa s'ha ideat una metodologia basada en yTRAP (Newby et al., 2017) que permet realitzar *screenings* de *highthroughput*.

S'ha observat que l'expressió de molècules prioniques causa problemes en la viabilitat de les cèl·lules de llevat així com una menor taxa de divisió. Això s'observa especialment en les cèl·lules que expressen sPFD i hA β 42 ja que són els pèptids que causen agregació. Els problemes de viabilitat de llevats que expressen pèptids prionics han estat prèviament i àmpliament descrits en la bibliografia pels que els resultats aquí presentats corroboren estudis previs (Newby et al., 2017; Summers and Cyr, 2011). De fet, els

llevats presenten mecanismes per a evitar que la seva descendència hereti els prions o mecanismes per a que la seva herència sigui asimètrica per a protegir part de la descendència (Newby et al., 2017; Saarikangas et al., 2017). En el cas dels transformants que expressen hSNCA no s'observen problemes de viabilitat ni de creixement pel que es creu que la seva agregació requereix de modificacions postraduccionals o mutacions addicionals. Addicionalment, s'ha descrit que es requereixen condicions molt específiques de temperatura, pH, contingut lipídic... per a la seva agregació i que tot i així es produeix de manera molt lenta (Leitao et al., 2018). El mecanisme d'agregació específic d'aquesta proteïna és encara àmpliament desconegut pel que es va decidir no prendre-la com a exemple per a establir les bases del mètode *d'screening*.

Tot i així, per a determinar si els efectes sobre la viabilitat o el creixement es produïen per l'hA β 42 *per se* o degut a la formació d'agregats es va decidir modificar la proteïna per tal de que no agregués però realitzant el menor nombre de canvis en la seva seqüència. La transformació dels llevats amb un plasmidi que codificava per aquesta proteïna mutada (hA β 42m) no portava al desenvolupament de problemes de creixement o viabilitat. En aquest sentit, el fenotip s'assimilava al de la soca WT i als controls de no agregació com hSNCA i cPFD. D'aquesta manera, es va confirmar que la proteïna *per se* no provoca problemes en el creixement i que, per tant, és la seva agregació la causa del fenotip observat, tal i com suggeria la bibliografia.

Un cop establerta hA β 42 com a control positiu de l'agregació i hA β 42m com a control negatiu, es va procedir a la posta a punt de l'*screening*. La metodologia d'*screening* proposada presenta una doble selecció: per creixement en galactosa i per fluorescència. Això s'aconsegueix, fusionant a l'extrem C-terminal de GAL4 la proteïna d'estudi i transformant les soques amb un plasmidi que conté *yeGfp* sota el control de *Gal4p*. En cas de que la proteïna agregui no hi haurà creixement degut a la impossibilitat de activar els gens de creixement en galactosa. Aquesta primera selecció permet treballar només amb aquelles soques que creixen, estalviant molt temps respecte altres metodologies com *yTRAP* en el que s'haurien d'avaluar totes les soques al presentar només la selecció per fluorescència. La selecció per fluorescència aporta la vessant quantitativa del mètode, ja que a major fluorescència emesa major serà la capacitat anti-agregativa del

pèptid estudiat. Els tests de viabilitat fan palès les grans dificultats de les soques hA β 42 per a créixer en medi amb galactosa, fins i tot, es podria considerar que el creixement és nul. Per contra, les soques hA β 42m presenten un creixement molt similar al WT indicant la reversió del fenotip. Tot i així, la soca que expressa hA β 42 també té un creixement menor en glucosa en comparació amb el WT. Aquest fet s'atribueix a que el GAL4 també realitza funcions com a repressor de gens quan es metabolitza glucosa el que podria estar afectant al fenotip de la soca. En aquest sentit, s'ha descrit que el KO de *Gal4* presenta un menor "fitness" fet anàleg a l'observat en aquest treball (Giaever et al., 2002; Qian et al., 2012). En futurs experiments, es podrien realitzar cinètiques de creixement de les diferents soques per tal d'avaluar si, efectivament, el creixement de hA β 42m és igual que el del WT en galactosa. Les cinètiques aportarien dades més quantitatives que la simple observació del fenotip a través del test de viabilitat.

Tot i així, els resultats obtinguts de pèrdua i recuperació del fenotip estableixen que la primera selecció de l'*screening* és suficientment bona per a seleccionar aquells mutants que passaran a ser estudiats en la segona fase.

L'estudi de la fluorescència es va realitzar gràcies a BudJ, seguint la metodologia establerta en articles anteriors (Ferrezuelo et al., 2012). Les soques que tenen hA β 42 fusionat a l'extrem C-terminal de GAL4 presenten una intensitat de fluorescència igual que el control de plasmidi buit, el que significa una abolicció completa de la fluorescència comparant amb una soca WT transformada amb YCpGal. Això posa de manifest que, efectivament, l'agregació de hA β 42 provoca un segrest de GAL4, impedit que activi la expressió de gens controlats per *Gal4p*. Per contra, l'addició de mutacions que provoquen que hA β 42 no agregui suposa una restauració del fenotip comparable a la soca WT YCpGAL. Aquest fet confirma que hA β 42 no presenta altres efectes sobre la fluorescència més enllà dels provocats per la seva agregació. D'aquesta manera, es pot concloure que és possible realitzar una segona selecció per fluorescència de les soques que hagin superat la primera selecció, i que serà prou potent per a recuperar el fenotip del WT en cas de que el pèptid antiprònic aconsegueixi bloquejar l'agregació. L'anàlisi d'aquestes dades per microscòpia i posteriorment el BudJ suposa una inversió de temps remarcable, aquest fet es podria millorar utilitzant tècniques de citometria per a l'anàlisi

dels mutants en comptes de realitzar un anàlisi individual cèl·lula a cèl·lula. Un altre problema que podria solucionar l'ús de la citometria és l'anàlisi de marcadors de viabilitat i de cicle cel·lular per tal d'assegurar-se de que les cèl·lules que no presenten fluorescència en soques que són fluorescentes (WT YCpGAL, hA β 42 YCpGAL...) es troben mortes o el seu cicle cel·lular es troba aturat. Això explicaria per que no tenen l'expressió de yeGFP a pesar d'haver sigut seleccionades per auxotròfia.

En un medi amb galactosa, l'expressió de *Gal4* es troba augmentada per tal d'activar els gens de metabolisme corresponent. Si les proteïnes a estudiar es troben fusionades a GAL4 també augmentarà la seva expressió provocant un augment dels efectes sobre el fenotip. És per aquest motiu, que es va intentar quantificar la quantitat de prió que es formava quan les cèl·lules es trobaven en glucosa i en galactosa. Desgraciadament, la aparició d'una banda inespecífica al realitzar el Western Blot amb un anticòs anti-FLAG va impedir realitzar aquesta quantificació. En un futur, seria bo utilitzar altres anticòs, per exemple, dirigits contra el pèptid hA β 42. D'aquests anticòs n' existeixen formes capaces de detectar les formes solubles i les formes agregades pel que permetria realitzar un bon control de la quantitat de proteïna agregada comparada amb la soluble.

Per últim, es va observar que el volum cel·lular de les soques que presentaven formes priòniques era major que el de les formes que no agregaven o el de la soca WT. La soca que presenta hA β 42m té un volum cel·lular igual que el de la WT pel que no és resultat de la introducció de vectors o l'expressió de proteïnes sinó de l'agregació dels prions.

Aquest fet es podria explicar degut a que la cèl·lula és capaç de detectar alts nivells d'agregació proteica, i s'evita entrar en fase de mitosi per a no transmetre aquests agregats. Aquest fet és una observació que no es troba documentada a la bibliografia i que serà publicada properament (Moreno et al., 2019)

Conclusions

Els objectius principals d'aquest treball eren posar a punt una metodologia per a la identificació de pèptids amb propietats antipriòniques i començar a realitzar un *screening* utilitzant aquesta metodologia. Es pot concloure que la metodologia ha estat posada a punt i que els seus controls són suficientment robustos per a poder identificar

antiprions. A pesar d'això, encara seria possible millorar-la en certs aspectes com la quantificació de proteïna per Western Blot o la realització de cinètiques de creixement.

Per motius de falta de temps, no ha estat possible assolir el segon objectiu d'iniciar una mutagènesi aleatòria de molècules priòniques per identificar antiprions. Això deixa obert un possible futur projecte en el que s'identificarien aquests pèptids i es provaria la seva capacitat en altres models com cultius neuronals.

Paral·lelament, tot i que no era un dels objectius, es va observar una nova característica fenotípica de les cèl·lules que presenten agregats, el que va servir per afegir noves dades a un altre projecte del laboratori que estudiava l'efecte de la proteòstasi en el control del cicle cel·lular.

Autoavaluació

La possibilitat de realitzar aquest treball m'ha brindat la oportunitat de realitzar una gran varietat de tècniques del DNA recombinant. La utilització de llevats com a model m'ha permès realitzar una gran quantitat d'experiments, això no hagués estat possible si hagués utilitzat neurones o altres cèl·lules de mamífer. Addicionalment, són uns organismes molt versàtils en els que es poden realitzar moltes tècniques del DNA recombinant de manera relativament senzilla i ràpida. Aquesta experiència amb els llevats com a model m'ha fet comprendre millor la importància que té l'ús de models.

El desenvolupament de la metodologia m'ha permès aplicar coneixements adquirits durant el grau i comprendre la importància d'un bon disseny experimental. Aquest treball, eminentment metodològic, posa de manifest la importància de tenir uns bons controls en experiments per tal de poder extreure conclusions.

També considero que aquestes pràctiques han ajudat a millorar el meu pensament crític al trobar-me amb obstacles com problemes amb les lligacions o alguns resultats inesperats.

Per últim, m'ha ajudat a adonar-me d'alguns punts febles que presenta el meu treball al laboratori i que espero haver millorat durant la meva estada de pràctiques. Durant la redacció del treball també m'he adonat que avantposo la realització d'experiments a

altres tasques com la recerca bibliogràfica o la redacció. En aquest punt, considero que hauria de millorar la meua capacitat organitzativa i la força de voluntat de realitzar tasques menys entretingudes però que són necessàries en el món de la recerca. La realització d'una estada de pràctiques i la redacció d'un treball de final de grau addicional no ha fet més que exagerar aquets últims problemes i ha estat tot un repte poder fer tot això en tan poc temps.

Tot i així, considero que l'experiència ha estat molt enriquidora tant a nivell professional com a nivell personal i espero que hagi servit per a millorar la meua capacitat de gestionar el temps.

Informació suplementària

Primers utilitzats

Es van dissenyar els *primers* de manera que complissin les recomanacions bàsiques d'uns bons *primers*. Les temperatures de *melting* de la Taula suplementària 1, corresponen a les calculades amb la zona del *primer* que hibrida amb la seqüència diana. Els primers 2307-O i 2308-O tenen temperatures de *melting* teòriques molt elevades perquè en la seva seqüència hi ha *missmatch*, pel que la seva temperatura de *melting* real serà menor.

Taula suplementària 1: Primers utilitzats durant aquest treball, les seves seqüències i les seves temperatures de melting (Tm).

Nom del <i>primer</i>	Seqüència	Tm (°C)
2174-O	GCACGTCTCGAGCTGCGGCCACTTCTAAATAAG	66,9
2175-O	GCACGTCTCGAGTCATTTGTCATCGTCATCTTTGTAATC AGAGCCGGAACCAGATCC	67,5
2307-O	CGCCGTCAATGCGGGTGGATCTGGTTC (Fosforilat en 5')	82,6
2308-O	CCGCCACGGTGAGTCCAGTGATTGCACCTTTGTTTG (Fosforilat en 5')	86,7
1679-O	ATTCGATGATGATGAAGATACCCACCACCAAACCCAA AAAAAGAGCGTACGCTGCAGGTCGAC	66,3
2203-O	TACATAAAAGAAGGCAAACGATGTATAAATGAAAGA AATATCGATGAATTCGAGCTCG	63,4
1681-O	CTAACCGTCCCACCCTCTCG	68,2
1135-O	GTCGACCTGCAGCGTACG	66,3
2251-O	CCTGAGAAAGCAACCTGACC	64,2

Vectors utilitzats

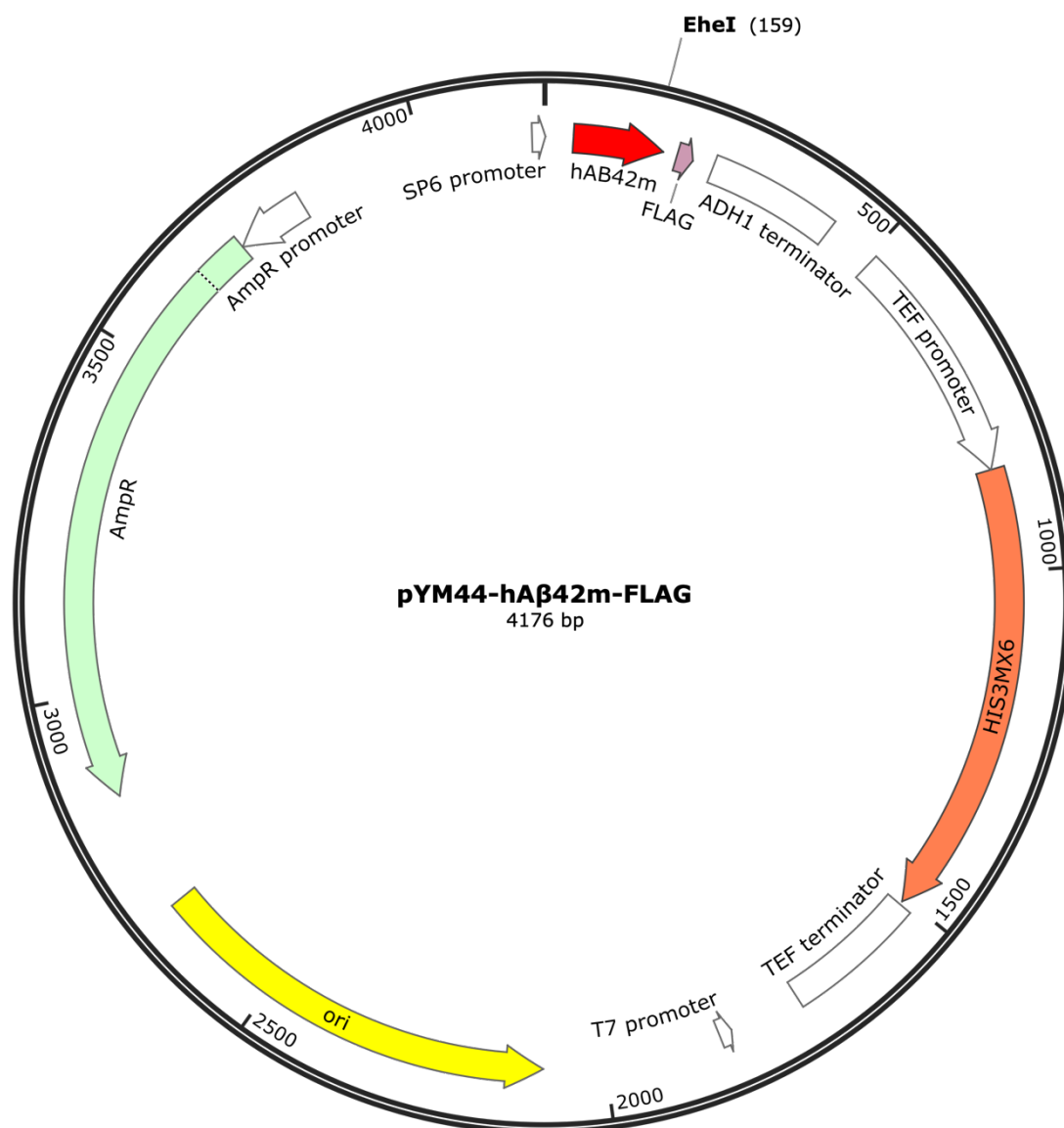


Figura Suplementària 1: Exemple del vector pYM44. En aquest cas concret es mostra el pYM44-hAβ42m-FLAG que presenta el pèptid hAβ42m amb FLAG fusionat. Es pot observar la diana de restricció per a Ehel (també coneguda com NarI). Addicionalment, s'observa que el vector presenta el gen de resistència a l'ampicil·lina (AmpR) i el gen HIS3MX6 que serveix per a realitzar selecció per auxotrofia d'histidina. També presenta un origen de replicació d'*E. coli* (ori) derivat de pUC, un promotor SP6 que permet la transcripció in vitro i un promotor T7 que és altament eficient. Aquest plasmidi deriva del pYM44 al que se li ha retirat yeGFP.

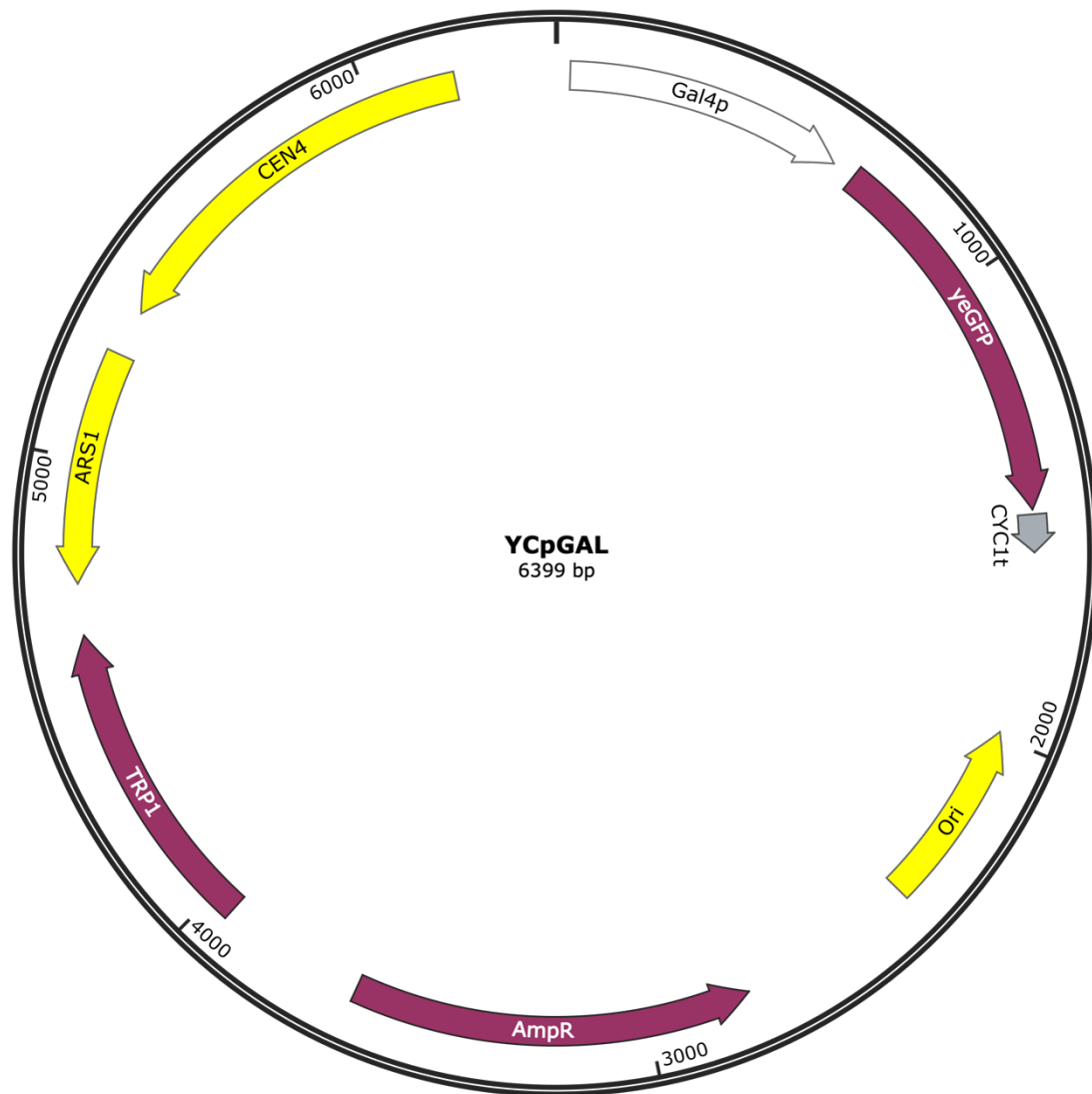


Figura Suplementària 2: Exemple de plasmidi YCp. En aquest cas concret es mostra el YCpGAL que presenta yeast-enhanced GFP (yeGFP) sota el control del promotor Gal4p. També presenta seqüències per a la replicació en *E. coli* (Ori) i en *S. cerevisiae* (ARS1 i CEN4). Té marcadors de selecció de resistència a l'ampicil·lina i de auxotrofia pel triptòfan. YCp22 és un plasmidi similar però no conté la seqüència de yeGFP i YCpGFP també té una estructura similar però té GFP sota el control de TEF1 de manera que GFP s'expressa constitutivament.

Referències

Alberti, S., Halfmann, R., King, O., Kapila, A., and Lindquist, S. (2009). A systematic survey identifies prions and illuminates sequence features of prionogenic proteins. *Cell* 137, 146–158.

Bagriantsev, S., and Liebman, S. (2006). Modulation of A β 42^{low-n} oligomerization using a novel yeast reporter system. *BMC Biol.* 4, art. 32.

Calderon-Garcidueñas, A.L., and Duyckaerts, C. (2018). Alzheimer disease. *Handbook of Clinical Neurology* 145, 325–337.

Ferrezuelo, F., Colomina, N., Palmisano, A., Garí, E., Gallego, C., Csikász-Nagy, A., and Aldea, M. (2012). The critical size is set at a single-cell level by growth rate to attain homeostasis and adaptation. *Nat. Commun.* 3, art. 1012.

Giaever, G., Chu, A.M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Véronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., André, B. (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418, 387–391.

Gold, M. (2017). Phase II clinical trials of anti-amyloid β antibodies: When is enough, enough? *Alzheimer's Dement.* 3, 402–409.

Ironside, J.W., Ritchie, D.L., and Head, M.W. (2018). Prion diseases. *Handbook of Clinical Neurology*, 145, 393–403.

Kalia, L. V, and Lang, A.E. (2015). Parkinson's disease. *Lancet* 386, 896–912.

Leitao, A., Bhumkar, A., Hunter, D.J.B., Gambin, Y., and Sierecki, E. (2018). Unveiling a selective mechanism for the inhibition of α -synuclein aggregation by β -synuclein. *Int. J. Mol. Sci.* 19, art. 334.

Melo, T.Q., Copray, S.J.C.V.M., and Ferrari, M.F.R. (2018). Alpha-synuclein toxicity on protein quality control, mitochondria and endoplasmic reticulum. *Neurochem. Res.* 43, 2212–2223.

Moreno, D.F., Jenkins K., Morlot S., Charvin G., Csikász-Nagy A., Aldea M. (2019). Proteostasis collapse halts G1 progression and delimits replicative lifespan in yeast. Submitted to *PLoS Biology*.

Newby, G.A., Kiriakov, S., Hallacli, E., Kayatekin, C., Tsvetkov, P., Mancuso, C.P., Bonner, J.M., Hesse, W.R., Chakrabortee, S., Manogaran, A.L. (2017). A genetic tool to track protein aggregates and control prion inheritance. *Cell* 171, 966-979.

Parsons, C.G., and Rammes, G. (2017). Preclinical to phase II amyloid beta (A β) peptide modulators under investigation for Alzheimer's disease. *Expert Opin. Investig. Drugs* 26, 579–592.

Parthasarathy, V., McClean, P.L., Hölscher, C., Taylor, M., Tinker, C., Jones, G., Kolosov, O., Salvati, E., Gregori, M., Masserini, M. (2013). A novel retro-inverso peptide inhibitor reduces amyloid deposition, oxidation and inflammation and stimulates neurogenesis in the APPswe/PS1 Δ E9 mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* 8, e54769.

Qian, W., Ma, D., Xiao, C., Wang, Z., and Zhang, J. (2012). The genomic landscape and evolutionary resolution of antagonistic pleiotropy in yeast. *Cell Rep.* 2, 1399–1410.

Ren, B., Robert, F., Wyrick, J.J., Aparicio, O., Jennings, E.G., Simon, I., Zeitlinger, J., Schreiber, J., Hannett, N., Kanin, E. (2000). Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science* 290, 2306–2309.

Saarikangas, J., Caudron, F., Prasad, R., Moreno, D.F., Bolognesi, A., Aldea, M., and Barral, Y. (2017). Compartmentalization of ER-bound chaperone confines protein deposit formation to the aging yeast cell. *Curr. Biol.* 27, 773–783.

Summers, D.W., and Cyr, D.M. (2011). Use of yeast as a system to study amyloid toxicity. *Methods* 53, 226–231.

Tenreiro, S., Munder, M.C., Alberti, S., and Outeiro, T.F. (2013). Harnessing the power of yeast to unravel the molecular basis of neurodegeneration. *J. Neurochem.* 127, 438–452.

Toombs, J.A., Petri, M., Paul, K.R., Kan, G.Y., Ben-Hur, A., and Ross, E.D. (2012). De novo design of synthetic prion domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 6519–6524.

Wang, F., Wang, X., Yuan, C.G., and Ma, J. (2010). Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein. *Science.* 327, 1132–1135.

Wurth, C., Guimard, N.K., and Hecht, M.H. (2002). Mutations that reduce aggregation of the Alzheimer's A β 42 peptide: an unbiased search for the sequence determinants of A β amyloidogenesis. *J. Mol. Biol.* 319, 1279–1290.