

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

**Análisis de la irisina, una proteína inducida por el ejercicio físico, como inhibidor de la agregación amiloide de alfa-sinucleína asociada a la enfermedad de Parkinson**

Universidad de Zaragoza

Máster en Biología Molecular y Celular

Facultad de Ciencias

Autora

Ángela Guiomar Estaún Allué

Directora

Dra. Nunilo Cremades Casasín

Curso 2023/2024



# ÍNDICE

GLOSARIO .....	3
RESUMEN/ABSTRACT .....	4
1. Introducción.....	5
1.1. Agregación amiloide de proteínas .....	5
1.2. $\alpha$ -sinucleína.....	7
1.3. Sinucleinopatías y la enfermedad de Parkinson .....	8
1.4. Irisina.....	11
2. Hipótesis y objetivos .....	13
2.1. Hipótesis central .....	13
2.2. Objetivos específicos.....	14
3. Materiales y métodos.....	15
3.1. Cultivos celulares.....	15
3.1.1. Cepas de <i>Escherichia coli</i> , condiciones de cultivo y transformación .....	15
3.1.2. Células eucariotas y condiciones de cultivo .....	16
3.2. Material genético .....	16
3.3. Obtención de $\alpha$ S humana recombinante y formación de fibras amiloides <i>in vitro</i> .....	17
3.4. Ensayo de expresión y solubilización de la irisina .....	18
3.5. Técnicas de separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida.....	19
3.5.1. Geles de SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie .....	19
3.5.2. Western Blot .....	19
3.6. Técnicas de clonaje.....	20
3.6.1. Amplificación de DNA por PCR.....	20
3.6.2. IVA Cloning.....	20
3.7. Técnicas de cultivo celular eucariota .....	21
3.7.1. Transfección.....	22
3.7.2. Preparación de la solución de fibras amiloides de $\alpha$ S.....	22
3.7.3. Evaluación de la citotoxicidad de la irisina mediante el ensayo de la resazurina. ....	23
3.8. Microscopía.....	23
3.8.1. Microscopía confocal de fluorescencia.....	23
3.8.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) .....	24
4. Resultados y discusión.....	25
4.1. Purificación de $\alpha$ S .....	25

4.2.	Prueba de sobreexpresión de irisina en cepas de <i>E. coli</i> .....	26
4.2.1.	Ensayos de solubilización .....	27
4.3.	Ensayos de elongación de fibras de $\alpha$ S <i>in cellulo</i> .....	31
4.3.1.	Generación de fibras, sonicación y medida mediante TEM .....	31
4.3.2.	Transfección de fibras en células HEK- $\alpha$ S-YFP .....	32
4.3.3.	Ensayo transfección de irisina en HEK- $\alpha$ S-GFP y HEK- $\alpha$ S-YFP .....	34
4.3.4.	Comparativa de la expresión de irisina en HEK293T y HEK $\alpha$ S-YFP, y ensayo de citotoxicidad .....	35
4.3.5.	Transfección de F1A y F1B en HEK293T- $\alpha$ S-YFP.....	37
4.3.6.	Ensayo de la capacidad inhibitoria de la irisina sobre la elongación de fibras amiloides.....	41
5.	Conclusiones / Conclusions .....	44
5.1.	Conclusiones .....	44
5.2.	Conclusions.....	44
6.	Bibliografía .....	46
	Anexos.....	48
1.	Plásmidos, genes sintéticos y cebadores .....	48
1.1.	Plásmidos de expresión procariota.....	48
1.2.	Plásmidos de expresión eucariota .....	50
1.3.	Cebadores empleados para la generación de los plásmidos de expresión procariota.....	51
1.4.	Cebadores empleados para la generación de los plásmidos de expresión eucariota .....	51
2.	Composición MasterMix y programa de la PCR .....	51
3.	Composición de los geles de SDS-PAGE .....	52
4.	Tablas de equivalencia de los volúmenes de urea en los que se resuspenden los diferentes pellets celulares .....	52

## GLOSARIO

<b>AD</b>	Alzheimer's disease (Enfermedad de Alzheimer)
<b><math>\alpha</math>S</b>	$\alpha$ -sinucleína
<b>Cryo-EM</b>	Criomicroscopía electrónica
<b>DLB</b>	Dementia with Lewy Bodies (Demencia con cuerpos de Lewy)
<b>DMEM</b>	Dulbecco's modified eagle medium
<b>DNA</b>	Desoxyribonucleic acid (Ácido Desoxirribonucleico)
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>FNDC5</b>	Fibronectin domain-containing protein 5 (Proteína 5 con dominio de fibronectina)
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
<b>IVA Cloning</b>	In vivo assembly cloning (Clonaje mediante ensamblado <i>in vivo</i> )
<b>IDP</b>	Intrinsically disordered protein (Proteína intrínsecamente desordenada)
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>MAO-B</b>	Monoamino oxidasa B
<b>MPTP</b>	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
<b>NAC</b>	Non-amyloid component (Componente no amiloide)
<b>MSA</b>	Multiple System Atrophy (Atrofia multisistémica)
<b>O/N</b>	Over night (Durante la noche)
<b>PBS</b>	Phosphate buffered solution (Solución tampón fosfato)
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
<b>PFA</b>	Paraformaldehido
<b>PD</b>	Parkinson's Disease (Enfermedad de Parkinson)
<b>SDS-PAGE</b>	Sodium dodecyl sulfate–Polyacrylamide gel electrophoresis (Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio)
<b>SNpc</b>	Substantia Nigra nigra pars compacta (Sustancia negra pars compacta)
<b>TEM</b>	Transmission electron microscopy (Microscopía electrónica de transmisión)
<b>WT</b>	Wild type (Tipo silvestre)
<b>YFP/GFP</b>	Yellow/Green Fluorescent fluorescent protein (Proteína fluorescente amarilla/verde)

## RESUMEN

La **agregación amiloide** de proteínas, proceso directamente relacionado con el desarrollo de **enfermedades neurodegenerativas** como Alzheimer, Parkinson y Huntington, consiste en el auto-ensamblaje de proteínas solubles en agregados insolubles formando **protofilamentos** que se agrupan para formar fibras, denominadas **fibras amiloides**, con una estructura común en **lámina beta cruzada** altamente estable y resistente a la degradación. La formación de fibras amiloides por parte de la proteína intrínsecamente desordenada  **$\alpha$ -sinucleína**, y su depósito en forma de **cuerpos** y **neuritas de Lewy** en el citosol de las **neuronas dopaminérgicas** de la *substantia nigra pars compacta* del cerebro, es la característica histopatológica de la enfermedad de **Parkinson**.

Recientemente se ha observado que la **irisina**, una mioquina producida durante el ejercicio físico, podría tener un **potencial terapéutico** en la prevención y reparación de daños neuronales en enfermedades neurodegenerativas. En concreto, se ha propuesto que la irisina podría convertirse en una **herramienta molecular clave** para tratar patologías asociadas a la agregación amiloide, aunque se requiere investigación que permita entender su **mecanismo de acción molecular**. En este trabajo, se ha propuesto la **hipótesis** de que la irisina podría inhibir la elongación de fibras amiloides bloqueando su formación y, por tanto, la propagación de neurodegeneración. Se ha desarrollado un plan experimental in vitro para probar dicha hipótesis en el contexto de la agregación amiloide de  $\alpha$ -sinucleína.

## ABSTRACT

Protein **amyloid aggregation**, process directly associated to the development of **neurodegenerative diseases** such as Alzheimer's, Parkinson's, and Huntington's, consists of the self-assembly of soluble proteins into insoluble aggregates in the form of **protofilaments** that group together to form fibers, refer to as **amyloid fibers**, which have a common, highly stable and degradation resistant, **cross-beta sheet structure**. The formation of amyloid fibers by the intrinsically disordered protein  **$\alpha$ -synuclein**, and its deposition in the form of **Lewy bodies** and **neurites** in the cytosol of **dopaminergic neurons** of the *substantia nigra pars compacta* in the brain, is the histopathological hallmark of **Parkinson's** disease.

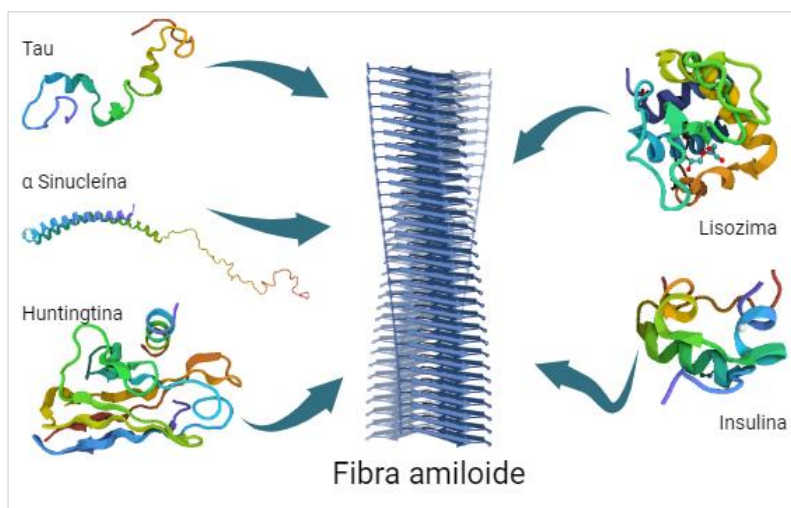
Recent studies have revealed that **irisin**, a myokine produced during physical exercise, could have a **therapeutic potential** in the prevention and repair of neuronal damage in neurodegenerative diseases. Particularly, it has been proposed that irisin could become a **key molecular tool** for treating pathologies associated with amyloid aggregation, although research is required to understand its **molecular mechanisms of action**. In this work, we have proposed the hypothesis that irisin could inhibit the elongation of amyloid fibers, thus blocking their formation and the propagation of

neurodegeneration. We have developed an in vitro experimental plan to test this **hypothesis** in the context of  $\alpha$ -synuclein amyloid aggregation.

## 1. Introducción

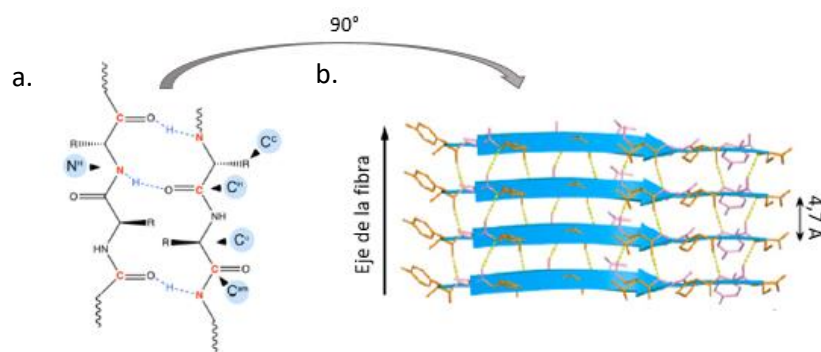
### 1.1. Agregación amiloide de proteínas

La agregación amiloide de proteínas es un proceso asociado al desarrollo de diversas enfermedades, tanto sistémicas como de tipo neurodegenerativo, entre las que se encuentra la atrofia multistémica, diabetes tipo II, la enfermedad de Alzheimer, Parkinson o Huntington (1). En este proceso, una proteína, generalmente **monomérica y soluble**, comienza a auto-ensamblarse formando inicialmente pequeños núcleos, denominados “semillas” (proceso denominado nucleación) a las que se adicionan monómeros de proteína en sus extremos (proceso denominado elongación), generando las típicas fibras amiloides encontradas en los pacientes. Estas fibras tienen una estructura común rica en lámina beta, y denominada estructura en **lámina beta cruzada**, característica de la **conformación amiloide** (2). Una vez adoptada, esta conformación es altamente estable, gracias a la red de interacciones, principalmente de **puentes de hidrógeno** entre átomos de la cadena polipeptídica principal, que le confiere una gran resistencia a la degradación. Este proceso es en principio **inherente** a cualquier proteína o cadena polipeptídica, siendo la conformación amiloide la conformación más estable que una proteína, en principio, puede adoptar (en un estado oligomérico) aunque se ve impedida por grandes barreras cinéticas (3). De esta manera, existe una gran **diversidad de proteínas** cuya agregación amiloide está asociada a enfermedad: desde proteínas intrínsecamente desordenadas (**IDPs**), como el caso de Tau en la enfermedad de Alzheimer (AD),  $\alpha$ -sinucleína en la enfermedad de Parkinson (PD), o huntingtina en la enfermedad de Huntington, así como proteínas **plegadas** con diferentes topologías estructurales, como la lisozima en la enfermedad de amiloidosis renal o la insulina en la diabetes tipo II (*Figura 1*).



**Figura 1. Ejemplos relevantes de proteínas que forman agregados amiloides relacionados con enfermedad.** Se muestra la variedad estructural de proteínas implicadas en agregación amiloide patológica: a la izquierda de la misma se representan IDPs (tau,  $\alpha$ -sinucleína y huntingtina), y a la derecha proteínas globulares (lisozima e insulina). Imagen generada mediante BioRender, empleando los códigos PDB: 2MZ7, 1XQ8, 3LRH, 2FBD y 1CPH, en orden de mención.

La estructura en lámina beta cruzada se caracteriza por una disposición específica de láminas beta de proteína que se apilan de forma paralela, una encima de la otra, y, por tanto, **perpendicular al eje** de la fibra, y que se encuentran estabilizadas por una **red de puentes de hidrógeno** con una distancia característica de **4.7 Å** (Figura 2) (2, 4). La existencia de esta red de puentes de hidrógeno propicia la yuxtaposición de interacciones entre las cadenas laterales de los aminoácidos según su carácter hidrofílico/hidrofóbico, y el alineamiento de estos residuos “complementarios” genera un apilamiento muy estrecho, lo que maximiza los contactos de puente de hidrógeno y enlaces de Van der Waals entre las cadenas laterales, a lo largo del eje de la fibra. Se generan, por tanto, dos tipos de interacciones, **inter e intramoleculares**, que se repiten a lo largo de la estructura de la fibra, y que tienen direcciones perpendiculares (las intermoleculares dentro del eje de la fibra, las intramoleculares perpendiculares al mismo), lo que dio lugar al nombre de estructura en **lámina beta cruzada**.



**Figura 2. Esquema de la formación de enlaces de puente de hidrógeno en la estructura en lámina β cruzada.** (a) Representación esquemática de la formación de enlaces de puente de hidrógeno entre el carbonilo de la cadena principal del péptido en una hebra β y el NH de la cadena principal del péptido en otra hebra β (4)(b) Disposición de las hojas β de forma perpendicular al eje de la fibra amiloide. Se muestran los enlaces de puente de hidrógeno entre las hebras (líneas amarillas discontinuas) con una disposición regular y paralela al eje de la fibra. (2)

El tipo concreto de interacciones y la disposición topológica de las cadenas polipeptídicas apiladas perpendicularmente al eje de la fibra que adopta una proteína depende de las condiciones de ensamblaje. Estudios recientes (5, 6) revelan que una misma proteína puede formar fibras con diferentes conformaciones, existiendo un complicado **polimorfismo amiloide**, en el que la creación de diferentes tipos de fibras acarrea propiedades tóxicas y patológicas variables, desencadenando una misma proteína diversas enfermedades asociadas a polimorfos amiloides concretos.

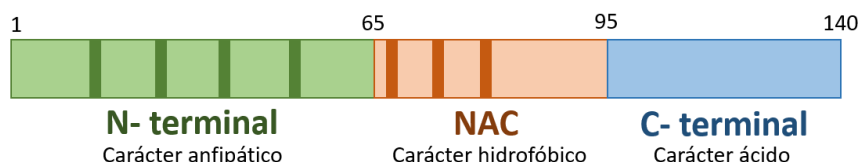
Existe un gran número de **enfermedades neurodegenerativas** asociadas con la agregación amiloide y en la mayoría de los casos, la agregación es iniciada por una proteína intrínsecamente desordenada. A diferencia de las proteínas globulares, las **IDPs** carecen de una conformación tridimensional fija en su estado nativo, lo que les otorga una **plasticidad estructural** que facilita su interacción con otras moléculas. Esta propiedad permite que las IDPs adopten múltiples conformaciones transitorias, algunas de las cuales pueden ser propensas al auto-ensamblaje y formación de **agregados**



**amiloides**. Estos agregados, así como conformaciones intermedias en la reacción de auto-ensamblaje, tienen **propiedades tóxicas** para las células, por lo que su formación está directamente relacionada con el desarrollo de patología: Tau y el péptido A $\beta$  en AD,  $\alpha$ -sinucleína en PD. Un proceso esencial para la progresión de la neurodegeneración es el proceso de elongación y propagación de fibras entre neuronas, lo que lleva a la multiplicación de las fibras. Es crucial, por tanto, desarrollar estrategias terapéuticas que puedan prevenir o revertir la agregación de proteínas y mitigar los efectos de las enfermedades neurodegenerativas. Una estrategia sería la **inhibición** del proceso de **elongación** de las fibras amiloides, impidiendo el apilamiento de nuevos monómeros de proteína en los extremos de las fibras amiloides y evitando así su propagación y la progresión de la neurodegeneración.

## 1.2. $\alpha$ -sinucleína

$\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ S) es una proteína pequeña, de 14 kDa de peso molecular, compuesta por 140 aminoácidos, codificada por el gen SNCA, el cual está localizado en el brazo largo del cromosoma 4 (7). Se encuentra dentro del grupo de las **IDPs**, ya que en su estado monomérico soluble no forma una estructura estable y persistente en ninguna región de su secuencia (se dice que tiene una estructura de ovillo desordenado, o *random coil*, en inglés). Al unirse a membranas lipídicas, dos tercios de su secuencia adoptan una conformación de **alfa-hélice anfipática**, mientras que al auto-ensamblarse en agregados amiloides, es la mitad de la proteína, en su región más central, la que adopta una conformación en **lámina beta** (8). En su secuencia se pueden diferenciar tres regiones principalmente (*Figura 3*).



**Figura 3. Representación de la secuencia de  $\alpha$ -sinucleína.** Las bandas marcadas, tanto en el dominio N-terminal (en verde) como en el NAC (en naranja), representan las repeticiones del motivo KTKEGV.

Un **dominio N-terminal**, que abarca del residuo 1 hasta el 65, con naturaleza **anfipática**. Contiene 4 repeticiones imperfectas del motivo hexamérico KTKEGV, altamente conservado y presente también en las apolipoproteínas, que adopta estructura en hélice-alfa anfipática al interactuar con bicapas lipídicas; propiedad relacionada con la función biológica de la proteína.

El **dominio central** ocupa los residuos 66-95. Contiene un motivo altamente **hidrofóbico**, conocido como componente  $\beta$  no amiloide, o **NAC** (*Non-Amyloid Component*), nombre que recibe por razones históricas. Este motivo resulta indispensable para el proceso de **agregación** de la proteína, ya que forma el núcleo hidrofóbico y está presente en las láminas  $\beta$  de las fibras amiloides. También presenta 3 motivos tipo KTKEGV en su parte inicial, lo que provoca que esta región pueda

interaccionar también con membranas lipídicas, aunque con menor afinidad a la región N-terminal.

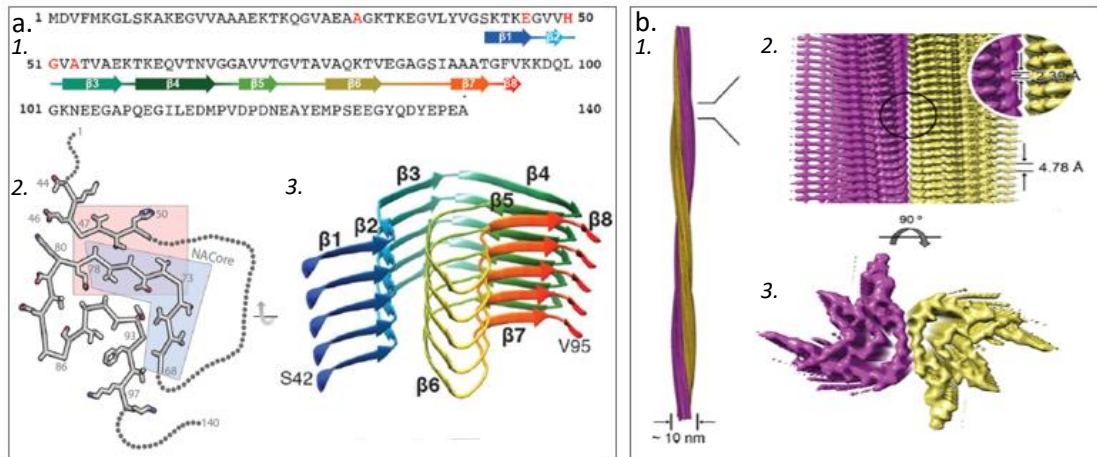
Por último, un **dominio C-terminal**, entre los residuos 96-140. Se trata de una región **desordenada**, que guarda un alto grado de similitud con las proteínas de choque térmico (9), implicada en la regulación de la localización celular y sus interacciones con metales (como el calcio), pequeñas moléculas y otras proteínas. Contiene diez residuos de glutámico y cinco de aspártico, lo que le confiere una elevada carga negativa a pH fisiológico.

Esta proteína se expresa ampliamente en el **sistema nervioso central** y periférico, predominantemente en las neuronas que componen el neocórtex, hipocampo, bulbo olfatorio, el núcleo motor dorsal, el cerebelo y el hipotálamo, específicamente en los **terminales presinápticos**, donde ejerce funciones de regulación de la **neurotransmisión** (10). Se ha detectado también un alto grado de expresión en otros tejidos, como el tracto gastrointestinal, existiendo depósitos de  $\alpha S$  en el sistema nervioso entérico. Resulta todavía desconocido si el proceso de agregación amiloide de  $\alpha S$  comienza en el estómago, esparciéndose por el sistema nervioso a partir del nervio vago, o aparece de forma independiente en múltiples sitios.

### **1.3. Sinucleinopatías y la enfermedad de Parkinson**

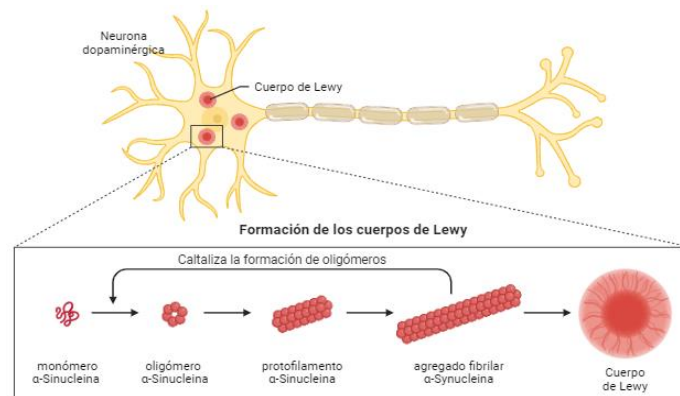
Las enfermedades de agregación causadas por la proteína  **$\alpha S$**  forman un subgrupo por sí mismas, conocido como **sinucleinopatías** (11). Cursan con la formación de agregados amiloides de la proteína, en forma de **cuerpos de Lewy** (LB; Lewy Bodies), **neuritas de Lewy** e **inclusiones en células gliales** (comunes en los oligodendrocitos), y engloban a la enfermedad de Parkinson (PD), la Demencia con Cuerpos de Lewy (DLB), la Atrofia Multisistémica (MSA), el Fallo Autonómico Primario y el Trastorno de la Conducta del Sueño REM.

Gracias a los avances en crio-microscopía electrónica (cryo-EM), se ha logrado determinar la estructura de fibras de  $\alpha S$  a elevada resolución, obtenidas de pacientes con diferentes sinucleinopatías, reflejando **diferentes topologías** de ensamblaje amiloide (12). Las fibras están generalmente compuestas por dos **protofilamentos entrelazados** en una hélice levógira donde los monómeros de alfa-sinucleína adoptan una topología tipo “y griega” (*Figura 4*).



**Figura 4. Estructura de las fibras amiloides formadas por  $\alpha$ S.** (a) *a1*, Esquema de la secuencia y localización de sus motivos estructurales, *a2*, Representación obtenida mediante resonancia magnética nuclear en estado sólido de los residuos 44-97 de la proteína, que engloban el dominio NAC y forman el núcleo de la fibra, *a3*, Representación de la ordenación en el espacio de las diferentes hebras beta (13, 14). (b) Reconstrucción mediante Cryo-EM del mapa de densidad de una fibra de  $\alpha$ S. *b1* representa la densidad calculada de una sola fibra; *b2* la vista lateral de un fragmento de la misma; *b3* la vista desde arriba. La fibra está formada por la interacción de dos protofilamentos iguales, marcados en morado y amarillo, respectivamente (12).

Los cuerpos de Lewy (15) son **inclusiones citoplasmáticas**, formados principalmente por depósitos fibrilares de  $\alpha$ S, pero también por una mezcla **heterogénea** de más de 90 moléculas, incluyendo ubiquitina, neurofilamento, proteínas relacionadas con el entorno mitocondrial, y moléculas implicadas en autofagia y formación de agregados (16).



**Figura 5. Representación de una neurona dopaminérgica con cuerpos de Lewy y miniatura de su proceso de formación.** Figura adaptada de BioRender.

Las neuritas de Lewy, por otra parte, son agregados de  $\alpha$ S, pero localizados en los **procesos neurales**, es decir, en las extensiones de las neuritas en lugar de en su citoplasma (17).

La **enfermedad de Parkinson (PD)** es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común, después del AD (15). La aparición de cuerpos y neuritas de Lewy implica la degeneración y muerte de las **neuronas dopaminérgicas**, que son las células cerebrales

productoras de dopamina, un neurotransmisor crucial para la coordinación y generación de movimientos musculares.

En España, según datos del Ministerio de Sanidad de 2020, se registraron 39,384 personas afectadas, con una tasa de 3.94 por cada 1,000 personas en Atención Primaria. La prevalencia es mayor en el grupo de edad de 85 a 89 años (30.82 por mil personas), seguido de los grupos de 90 a 94 años (27.89) y de 80 a 84 años (26.57). En todos estos grupos, la prevalencia es mayor en hombres que en mujeres, con una diferencia de hasta un 20.65%. Considerando la tendencia creciente en el número de personas afectadas, se prevé que la enfermedad de Parkinson alcance **proporciones pandémicas**. Según proyecciones, en los próximos 20 años el número de afectados podría superar los 14 millones a nivel mundial. Por este motivo, supone un problema de gran magnitud, gravedad y complejidad (18).

Su **causa es desconocida**, y la mayoría de casos son **idiopáticos**, aunque se cree que resulta de una combinación de factores genéticos, ambientales (exposición a pesticidas y otros productos químicos, como, la neurotoxina MPTP) y conductuales (consumo de cafeína, nicotina o estilo de vida) (19). Se estima que el 10% de los casos se deben a **factores genéticos**, mientras que en el 90% restante no se conoce la causa exacta. Dentro de los defectos genéticos que se han asociado al desarrollo de esta enfermedad (PD de tipo monogénico) destacan mutaciones puntuales en el gen **SNCA**, que codifica para la proteína  $\alpha S$ , así como duplicaciones y triplicaciones del gen silvestre (7). Por otro lado, dentro de los casos idiopáticos, sin asociación directa genética asociada (todavía), se han identificado varios factores y *loci* de riesgo entre los que destaca el gen SNCA, así como otros genes asociados a función mitocondrial y lisosomal (LRRK2, PRKN, PINK1, y GBA) (18).

Los síntomas característicos de la PD son la **bradicinesia** (lentitud en los movimientos voluntarios), la **discinesia** (movimientos involuntarios), la **rigidez** en las extremidades, el **temblor** en reposo y la pérdida del **equilibrio**. Pese a ser esencialmente un trastorno del movimiento, los pacientes afectados a menudo desarrollan otras alteraciones neurológicas de tipo no motor, como **depresión, demencia y dolor**, lo que provoca un nivel de discapacidad grave en el paciente.

Como prognosis, se trata de una enfermedad degenerativa y la velocidad de deterioro varía considerablemente dependiendo del individuo, aunque resulta muy común que suponga una **disminución de la esperanza de vida**.

Actualmente, la **investigación** de los procesos patológicos que llevan a la formación de las fibras amiloides y de su inhibición, es un campo de estudio en auge, pues **no existe** a día de hoy un **tratamiento** que provoque una completa eliminación de los síntomas, aunque sí se cuenta con **opciones terapéuticas** para el alivio de los síntomas. Estas consisten en fármacos dopaminérgicos, como levodopa, agonistas

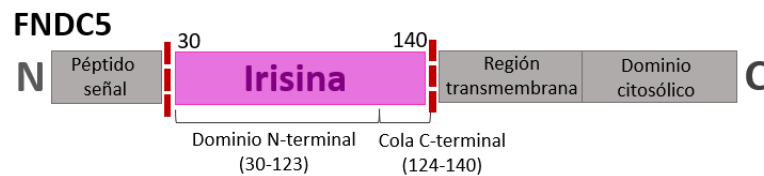
dopaminérgicos o inhibidores de la MAO-B, cuyo objetivo es aumentar los niveles de dopamina en el cerebro, aliviando los síntomas motores, complementado con rehabilitación y terapia física.

En 2012 se realizó el hallazgo de la proteína **irisina**, y recientemente se ha demostrado experimentalmente que ésta promueve una **acción protectora** y de reparación de las **neuronas dopaminérgicas** en PD, aunque no se ha establecido el mecanismo concreto por el cual tendría estos efectos. En cualquier caso, estos estudios sugieren que esta proteína podría desempeñar un papel neuroprotector y mejorar la función cognitiva, lo que abre la posibilidad de desarrollar nuevas **estrategias terapéuticas** basadas en ella para combatir la progresión de PD y mejorar la calidad de vida de los pacientes (20).

#### 1.4. Irisina

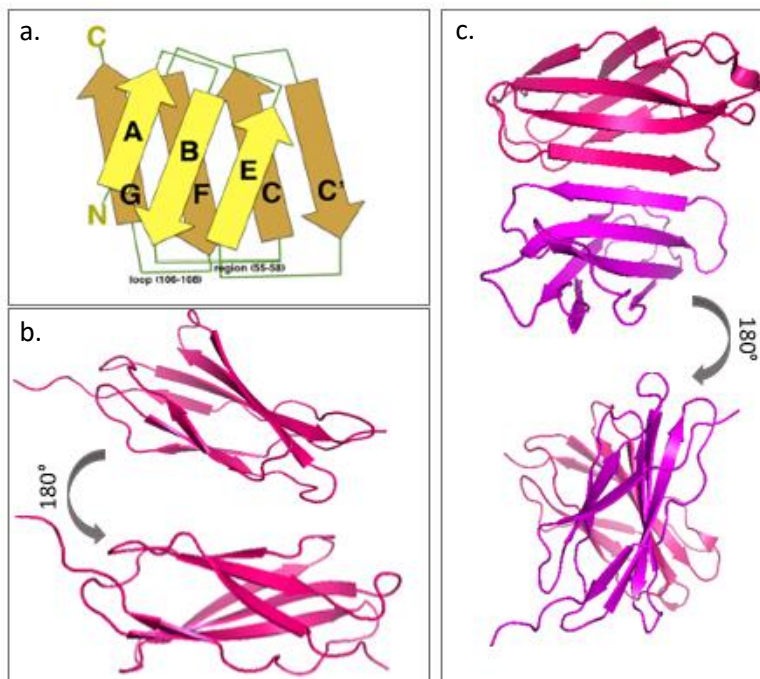
La irisina es una mioquina cuya expresión se ve inducida mediante el **ejercicio físico**. Se produce mediante la escisión del ectodominio extracelular del receptor **FND5** y así circula por sangre (21). Estimula la conversión de grasa blanca a marrón, lo que genera la hipótesis de que se une a un receptor desconocido. La grasa marrón promueve la disipación de energía, por lo que las mioquinas que promueven la transformación a la misma, tienen potenciales beneficios en el tratamiento de la obesidad y los desórdenes metabólicos, mediante el aumento de la expresión de la proteína desacoplante 1 (UCP1) (22). Con respecto a las enfermedades neurodegenerativas, son ampliamente conocidos los efectos beneficiosos del **ejercicio físico**: aumento de la neurogénesis en el hipocampo, aumento de la plasticidad sináptica en el giro dentado y reducción de la neuroinflamación (23), aunque todavía **no están claros los mediadores** que provocan estos efectos cognitivos. La sobreexpresión de FND5 (precursor de la irisina) en hígado de ratones (100% idéntico en secuencia al precursor humano), simula la estimulación de la expresión de un programa genético similar al del ejercicio en el hipocampo. Existen pruebas de que la sobreexpresión de irisina resulta suficiente para **aumentar la función cognitiva y reducir neuroinflamación** en dos modelos animales de AD (23, 24).

Este polipéptido inducido por el ejercicio, es secretado por el músculo esquelético y capaz de cruzar la **barrera hematoencefálica** (25). Se ha reportado que la irisina previene la **neurodegeneración** provocada por  $\alpha$ S, evitando la pérdida de neuronas dopaminérgicas y reduciendo la patogenicidad de los agregados de  $\alpha$ S (20). La elevación de irisina en sangre de ratones ha demostrado normalizar las manifestaciones histológicas en la SNpc y la sintomatología de PD. A su vez, se ha reportado que la irisina recupera la plasticidad sináptica y los defectos en la memoria en modelos de AD (23). Esto sugiere que esta proteína tiene un **potencial valor terapéutico en el PD** y otros trastornos neurodegenerativos que conlleven la agregación amiloide, aunque todavía no se conoce el **mecanismo molecular** por el que lleva a cabo este efecto.



**Figura 6. Secuencia de FNDC5.** En gris, los dominios exclusivos de FNDC5, en rosa el fragmento que, una vez realizado el corte (marcado por una línea roja discontinua), forma la irisina madura

La **irisina** corresponde a los residuos 30-140 del receptor transmembrana FNDC5, tras eliminar el péptido señal N-terminal de **29 residuos**. Su estructura (*Figura 6*) se compone de un **dominio N-terminal** (residuos 30-123), con homología a los dominios FNIII, muy conservados en los ectodominios de receptores. Se organiza en forma de una lámina beta de 4 hebras, que se apila de una manera estrecha con otra lámina beta de 3 hebras, con la topología estructural que puede observarse en la *figura 7* formando una **lámina continua y antiparalela**. El núcleo de esta lámina se ve estabilizado por 10 puentes de hidrógeno entre las dos láminas beta que interactúan, así como por la existencia de interacciones entre las cadenas laterales de las subunidades vecinas, que aumentan todavía más la estabilidad. Mencionar que cuenta con dos bucles flexibles, sugeridos como candidatos a la interacción con otras proteínas. Por último, presenta una **cola C-terminal** (residuos 124-140), mayormente **desordenada**.



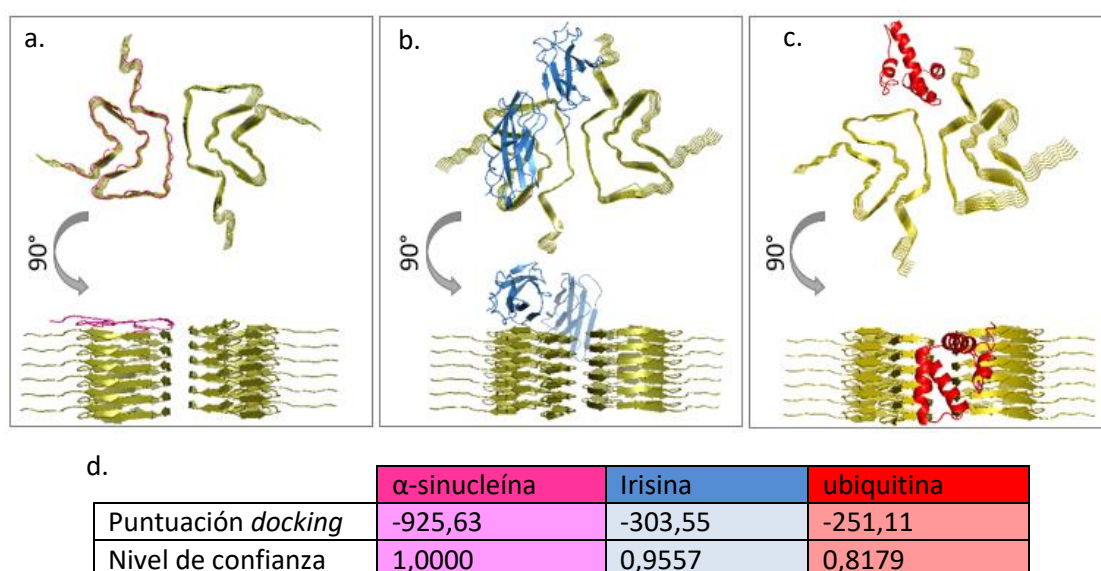
**Figura 7. Representación estructural de la irisina.** (a) Esquema de la disposición de la lámina beta continua de 8 hebras formada por la interacción entre las mismas, (21). (b) Representación de la estructura de su monómero, generada mediante PyMol, a partir de su archivo PDB, con código 4LSD. En la imagen se observan 2 ángulos diferentes del mismo monómero. (c) Representación de la forma dimérica de la proteína

## 2. Hipótesis y objetivos

### 2.1. Hipótesis central

En el presente trabajo se ha hipotetizado que la irisina, con una estructura en **lámina beta reminiscente a la estructura en lámina beta-cruzada de las fibras amiloides**, podría establecer **interacciones**, principalmente de puente de hidrógeno, con los **extremos de la fibra amiloide de  $\alpha$ S** (con los grupos reactivos disponibles en cada extremo de la fibra), evitando así la unión de otros monómeros de  $\alpha$ S, y, por tanto, el proceso de elongación de las fibras. Existen evidencias de la existencia de **fibras amiloides mixtas**, formadas por la co-agregación de Tau y  $\alpha$ S en muestras de pacientes (31, 32) y recreadas *in vitro* (26), que soportan la idea de la posible introducción de una proteína diferente a un extremo de una fibra amiloide, generando agregados heterogéneos, que en el caso de la irisina serían incompatibles con una elongación posterior.

Como paso previo al desarrollo del proyecto experimental, se llevó a cabo un ensayo de **acoplamiento bioinformático**, o *docking*, empleando el servidor **HDOCK** (Huang Laboratory, School of Physics Huazhong University of Science and Technology), de una **fibra de  $\alpha$ S con la irisina**, con el objetivo de explorar la viabilidad de la hipótesis mediante métodos predictivos computacionales (*Figura 8b*). Debido a que estos servidores ofrecen puntuaciones y valores propios que deben tenerse en consideración de manera relativa, se realizaron dos acoplamientos, uno positivo con un monómero de  $\alpha$ S con la estructura que adopta en la fibra (*Figura 8a*) y otro con ubiquitina, con un tamaño similar a  $\alpha$ S y a la irisina, como proteína control negativa (*Figura 8c*), para poder hacer un análisis comparativo.



**Figura 8. Resultado del docking bioinformático obtenido mediante el servidor HDOCK.** La fibra amiloide de  $\alpha$ S (PDB: 6a6b) se muestra en amarillo, el monómero de  $\alpha$ S en la conformación amiloide (acoplamiento perfecto) en rosa en el panel (a), el dímero de irisina en azul en el panel (b) y ubiquitina en rojo en el panel. (c) Imágenes generadas mediante PyMol. Las puntuaciones de los acoplamientos realizados por el servidor en cada caso se muestran en la tabla (d)

En la *figura 8d* se muestran las puntuaciones ofrecidas por el servidor, que informan acerca de la calidad de los resultados, siendo estos la puntuación del *docking*, un valor que se relaciona con la energía de unión del complejo (por tanto, cuanto más negativo, más estable sería la formación del complejo), aunque hay que tener en cuenta que estos valores deben ser tomados como valores relativos. También se recoge el nivel de confianza, que indica la posibilidad de dos moléculas de unirse, siendo más posible cuanto más se acerca el valor a 1, aunque de nuevo, se trata de un valor hipotético calculado por el servidor.

En el *docking* de la irisina, en **6 de los 10 modelos** propuestos por el programa, se predice que la irisina se una a los **extremos de la fibra**, de acuerdo a nuestra hipótesis. Observando los valores numéricos que ofrece el servidor, se observa que tiene una puntuación de *docking* menor que la para la  $\alpha S$ , lo que tiene sentido, ya que esta última presenta una unión perfecta, pero mayor, tanto en puntuación de *docking*, como en nivel de confianza, respecto a la ubiquitina, proteína usada como control negativo.

Los resultados del *docking*, aunque se traten tan solo de una **aproximación bioinformática**, muestran la **posibilidad de la unión** de la proteína de interés con la fibra amiloide en los extremos de elongación de la fibra, sirviendo como base para el desarrollo del proyecto experimental.

## 2.2. Objetivos específicos

1. Elaboración de **vectores** que permitan la expresión de **irisina** en cultivos celulares, tanto **procariotas** como **eucariotas**.
2. Llevar a cabo la **purificación** de **irisina** expresada de forma **recombinante**, para su utilización en **estudios *in vitro*** de interacción con fibras de  $\alpha S$ .
3. Puesta a punto de **estudios *in-cellulo*** del proceso de **elongación amiloide** en células que expresan de forma constitutiva  **$\alpha S$** .
4. Estudiar la expresión de **irisina** en tres líneas celulares **eucariotas**, HEK293T, HEK293T  $\alpha S$  YFP y HEK293T  $\alpha S$  GFP
5. Evaluar el posible efecto **inhibidor** de la **elongación** de fibras amiloides de  $\alpha S$  por parte de **irisina** en un **modelo celular**.



### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Cultivos celulares

##### 3.1.1. Cepas de *Escherichia coli*, condiciones de cultivo y transformación

La *tabla 1* recoge las cepas de *Escherichia coli* empleadas en este estudio. ***E. coli* BL21 (DE3)** contiene el locus DE3, codificante para la T7 RNA polimerasa del bacteriófago T7, bajo regulación del promotor lacUV5, permitiendo así su inducción por lactosa y su análogo IPTG. Carece además de las proteasas Lon y OmpT, lo que reduce la degradación de proteínas heterólogas. Por tanto, se empleó esta cepa como primera aproximación para la sobreexpresión de la proteína de interés. ***E. coli* C41 (DE3)**, contiene mutaciones seleccionadas fenotípicamente, que le confieren tolerancia a la expresión de proteínas recombinantes que podrían resultar potencialmente tóxicas. Por otro lado, se utilizó también ***E. coli* Rosetta (DE3)pLysS**, que es una cepa derivada de las BL21, que contiene codones raramente empleados en *E. coli*, de manera que permite una traducción “universal”, sin presentar las limitaciones propias de otras cepas de la misma bacteria. Por último, ***E. coli* XL10-Gold**, que destaca por su alta eficiencia de transformación, permitiendo la introducción de grandes cantidades de DNA plasmídico, con una alta tasa de éxito, resultando muy útil para experimentos de biología molecular y procesos de clonaje.

Cepa	Genotipo
BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> , ompT, hsdSB (rB <sup>-</sup> , mB <sup>-</sup> ), gal, dcm, λ(DE3)
C41	F <sup>-</sup> , ompT, hsdSB (rB <sup>-</sup> mB <sup>-</sup> ), gal, dcm (DE3)
Rosetta pLysS	F <sup>-</sup> , ompT, hsdSB (rB <sup>-</sup> mB <sup>-</sup> ), gal, dcm (DE3), pLysSRARE (CamR)
XL10-Gold	Tet <sup>r</sup> Δ( <i>mcrA</i> )183, Δ( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> )173, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , Hte [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10</i> (Tet <sup>r</sup> ) Amy Cam <sup>r</sup> ]

Tabla 1. Cepas de *E.coli* utilizadas a lo largo del trabajo

Para el cultivo de *E. coli* se empleó medio de cultivo **Luria-Bertani (LB)**, compuesto por 10 g/L de triptona, 5 g/L de NaCl y 5 g/L de extracto de levadura, disueltos en agua destilada y esterilizados mediante autoclave. Los cultivos en medio líquido se incubaron a 37 °C y 220 rpm en un agitador orbital. En el caso de cultivos en medio sólido, éste se suplementó con agar al 1,5 % (p/v) y las placas se incubaron a 37 °C en una estufa de cultivos. Cuando resultó necesario, se añadieron los antibióticos kanamicina y ampicilina a 50 y 100 µg/mL, respectivamente, para garantizar la selección positiva de las bacterias transformadas.

Para su transformación con plásmidos, se utilizó la técnica de **choque térmico**. Se incubaron 25 µL de stock de células con 1 µL de plásmido durante 30 segundos, a 42 °C. Inmediatamente después, el tubo con células se introdujo durante 2 minutos en hielo, tras lo cual se añadieron 200 µL de medio LB y se incubó el cultivo durante 1 hora a 37 °C y 220 rpm de agitación. Pasado ese tiempo, se sembraron 100 µL del cultivo en

una placa de LB agar suplementada con 200 µg/mL del antibiótico pertinente, y se incubaron unas 15 h a 37 °C.

### 3.1.2. Células eucariotas y condiciones de cultivo

En este proyecto se emplearon tres líneas celulares eucariotas que derivan de la línea celular **HEK293T**. Esta proviene originalmente de una muestra de adenocarcinoma de riñón humano, y son por tanto células humanas de adenocarcinoma inmortalizadas (mediante la expresión de la proteína T grande del virus SV40), que destacan por su alta eficiencia de transfección, resultando útiles para la expresión transitoria de proteínas recombinantes en cultivos celulares de mamífero. Además de la línea celular madre, se utilizaron dos líneas celulares que derivan de HEK293T y que expresan de forma estable la proteína  $\alpha$ S etiquetada con bien la proteína YFP (*yellow fluorescence protein*), **HEK293- $\alpha$ SYFP**, o GFP (*green fluorescence protein*), **HEK293- $\alpha$ SGFP**. Estas dos líneas celulares fueron cedidas amablemente por el Prof. Marc Diamond a través de un acuerdo de transferencia de material entre UT Southwestern Medical Center y la Universidad de Zaragoza.

Se empleó medio de cultivo **completo DMEM** (Dulbecco's Modified Eagle Medium, PAN-Biotech), suplementado con un 10% de suero fetal bovino, un 1 % de penicilina/estreptomicina, 1 % de glutamina estable (GlutaMax) y 1 % de Anfotericina, y se introducen en incubadores tipo estufa con una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>, a 37 °C y con una humedad del 80-90 %. Para el mantenimiento en el tiempo de estos cultivos, se realizó dos veces por semana el pasaje de las células, cuando la confluencia de las mismas alcanzaba valores del 80-90%. Este proceso consiste en soltar las células adheridas mediante una incubación con trypsin (una proteasa ampliamente usada para disociar células) y sembrar las células en una botella de cultivo nueva (T25, ThermoScientific), poniendo una cantidad normalmente 10 veces menor a la inicial.

## 3.2. Material genético

Para este proyecto fue necesario el diseño y producción de plásmidos que permitieran la expresión de la **irisina**, tanto en células procariotas como eucariotas, elaborados a partir de plásmidos comerciales y genes sintéticos, mediante la técnica **IVA-Cloning** (*Apartado 3.6.2*). Todos ellos aparecen recogidos en la *tabla 2*.

Plásmido	Organismo	Especificaciones
pET15b-His-3C-irisin	Procariota	Plásmido pET15b que expresa irisina, con 6 Histidinas en su extremo N terminal, así como sitios de corte para las proteasas 3C y Trombina
pET15b-His-irisin	Procariota	Delección del sitio de corte de trombina y de proteasa 3C del plásmido pET15b-His-3C-irisin
pET15b-His-irisin_M1D	Procariota	Delección del sitio de corte de trombina y de proteasa 3C e introducción de mutación M->D en el primer residuo
pJac346_irisin	Eucariota	Plásmido pEGFP_N1, con el inserto irisina-mCherry
pJac346_irisin_delmCherry	Eucariota	Delección del gen que codifica para la proteína fluorescente mCherry del plásmido pJac346_irisin

Tabla 2. Plásmidos empleados

En el *Anexo 1*, se recogen los mapas de los plásmidos usados en este trabajo, las secuencias de los genes sintéticos y cebadores empleados para su inserción en cada plásmido.

### **3.3. Obtención de $\alpha$ S humana recombinante y formación de fibras amiloides *in vitro***

Para llevar a cabo la **expresión y purificación** de la proteína  **$\alpha$ S humana** de forma recombinante, se siguió el protocolo optimizado por el grupo de investigación. Para ello, se transformaron cepas de *E. coli* **BL21** con el plásmido de expresión en procariontas **pT-7- $\alpha$ S** disponible en el laboratorio. La expresión se realizó con 1 mM de IPTG a 28 °C por unas 15 h, tras lo cual se obtuvo la fracción celular por centrifugación. Este protocolo de purificación comenzó por una sonicación de los cultivos inducidos, una vez transcurrido el tiempo necesario, tras lo que se realizó una centrifugación para separar la fracción soluble de la insoluble. Esta fracción soluble obtenida se sometió a un proceso de precipitación proteica por hervido (80-95 °C, 20 minutos), de manera que las proteínas sensibles al calor precipitan, mientras que  $\alpha$ S, al tratarse de una IDP, permanece soluble, haciendo posible separarlas mediante otra centrifugación. Además, se realizó un paso de precipitación del DNA, mediante la adición de sulfato de estreptomicina, y su separación por centrifuga. A continuación, se provocó la precipitación de  $\alpha$ S añadiendo sulfato amónico, seguida de centrifugación. El precipitado, altamente concentrado en  $\alpha$ S, se resuspendió en tampón 25 mM de Tris-HCl, a un pH de 7,7 (que recibe el nombre de **tampón A**), y se expuso a un proceso de diálisis para eliminar el sulfato amónico de la solución de proteína.

Una vez obtenida la solución concentrada en  $\alpha$ S, se llevó a cabo un proceso de purificación mediante **cromatografía de intercambio aniónico** utilizando la columna HiPrep™ Q FF 16/10 (Cytiva GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, England, UK), que permite realizar una separación de los componentes de la disolución en función de su carga. Para ello se mezclan dos soluciones, el tampón A anteriormente descrito, y **tampón B** (25 mM Tris-HCl, 1,5 M NaCl, pH 7,7), de manera que, al aumentar el porcentaje en volumen del segundo, se aumenta la concentración de sal, provocando la elución de los componentes de la solución, en función de la fortaleza de unión a la columna. Un primer aumento a 7,5 % de tampón B provocó la elución de aquellas proteínas unidas de manera no específica, a un 20 %, la elución de  $\alpha$ S, y a un 100 % de tampón B, la eliminación de los restos de DNA que aún quedan en solución. Finalmente, las fracciones recogidas en las que se encuentra  $\alpha$ S se sometieron a otro proceso de cromatografía, en este caso de **exclusión molecular**, empleando una columna HiLoad 26/600 Superdex 75 Prep Grade (GE Healthcare, Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia), mediante la que se separaron los componentes en función de su tamaño, aislando los fragmentos de proteína, de los monómeros de proteína intactos y de los oligómeros de proteína formados durante el proceso de expresión y purificación. De esta manera, se obtuvieron alícuotas de  $\alpha$ S monomérica pura que se almacenaron a -80 °C. La

concentración de proteína en las alícuotas se determinó por absorbancia a 275 nm utilizando un coeficiente de extinción de 5600 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

Se formaron **fibras amiloides de  $\alpha$ S** *in vitro* siguiendo protocolos ya establecidos (27). En este estudio, las fibras amiloides de  $\alpha$ S (tanto marcadas con la sonda fluorescente **Atto647N** como **sin marcaje**) fueron generadas por otros miembros del grupo de investigación.

### 3.4. Ensayo de expresión y solubilización de la irisina

Con la intención de **expresar y purificar irisina** de forma recombinante en cepas de *E. coli*, se realizaron primero **pruebas de expresión** a pequeña escala para determinar la solubilidad de la proteína.

Para ello, se prepararon 3 cultivos de diferentes cepas: **BL21, C41, y Rosetta pLyss** (*Apartado 3.1.1*). Para la transformación se utilizó inicialmente el plásmido **pET15b-His-3C-irisin** en un tubo falcon con 10 mL de medio LB estéril, suplementado con 100  $\mu$ g/mL de ampicilina, que se incubó a 37 °C y 220 rpm, monitorizando su crecimiento mediante medidas de densidad óptica de los cultivos a una longitud de onda de 600 nm. Cuando la densidad óptica alcanzó un valor de 0,7 (con el objetivo de encontrar el cultivo en la fase exponencial de la curva de crecimiento, permitiendo una mayor productividad en cuanto a la sobreexpresión de proteína), se dividió el cultivo en dos tubos de 5 mL. En cada condición a uno de los cultivos se le induce la expresión del promotor lacUV5, mediante la adición de 1mM de IPTG y el otro se dejó sin inducir, a modo de control. Esto se hizo para las 3 condiciones de inducción, que se indican en la *tabla 3* para cada cepa de *E. coli*.

Cond. Inducción	2h a 37 °C		4h a 30°C		O/N a 18°C	
IPTG 1 mM	-	+	-	+	-	+

Tabla 3. Esquema de las condiciones de inducción estudiadas en la prueba de sobreexpresión para cada cepa bacteriana. O/N significa incubación por la noche (*overnight*), entorno a unas 15h.

Para determinar el nivel de sobreexpresión en las condiciones estudiadas, se llevó a cabo una **electroforesis** en **condiciones desnaturalizantes** en geles de **poliacrilamida al 15 %**, técnica que se describe en el *apartado 3.5.1* de este trabajo. Para ello se realizó una centrifugación, con el objetivo de separar las células del medio de cultivo, obteniendo un sedimentado (*pellet*) que se resuspende en el tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 300 mM NaCl, suplementado con 2 mM DTT y 5 % (v/v) de cocktail con inhibidores de proteasas), para después someter la mezcla a sonicación, con 10 ciclos de 30 segundos de sonicación (a una amplitud de 80) y 30 segundos de descanso. Tras realizar la rotura celular, se separaron el sobrenadante y el pellet mediante una centrifugación de 30 minutos a 14000 rpm y 4 °C, para asegurar la precipitación de membranas, orgánulos celulares y cualquier agregado de proteína. Posteriormente, se añadieron volúmenes proporcionales de urea 6 M, asegurando el mismo nivel de

dilución en cada muestra en la fracción de pellet (se recogen los diferentes pesos de los pellets y los volúmenes añadidos en las *Tablas A.5 a, b y c* del *Anexo 4*). Se estudiaron los resultados de esta prueba mediante electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE, y para confirmar la localización de la proteína, se realizó un Western Blot, ambas técnicas son descritas en el siguiente apartado.

### **3.5. Técnicas de separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida**

#### **3.5.1. Geles de SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie**

Para llevar a cabo esta técnica se emplearon geles compuestos de una región **separadora al 15 % de acrilamida-bisacrilamida** y una región **concentradora, al 4 %**. Se recoge la composición exacta de estos geles en el *Anexo 3, tabla A.4*.

Las muestras a analizar deben encontrarse resuspendidas en Laemmli Buffer 4x (volúmenes 15  $\mu$ L/5 $\mu$ L), y hervidas a 92 °C durante 10 minutos, para cargar posteriormente 12  $\mu$ L de la solución en cada pocillo, utilizando como marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder 10-180 kDa, (Thermo Scientific). Se llevó a cabo la electroforesis en tampón Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 200 mM y SDS 3,5 mM, a una diferencia de intensidad de 150 V, durante unos 90 minutos.

La visualización de las bandas de proteína en el gel se realizó mediante **tinción con azul de Coomassie**. Para ello, se añadió una solución de azul de Coomassie G-250 al 1 % (p/v) en 10 % ácido acético y 50 % metanol al gel, quedando éste sumergido en la solución de azul de Coomassie, durante 25-30 minutos. Posteriormente se realizó un paso de decoloración mediante una solución de 10 % ácido acético, 25 % metanol y 65% de agua, empleando oscilación basculante continua en ambos casos, tras lo cual el gel se visualizó en un transiluminador ChemiDoc (Bio-Rad).

#### **3.5.2. Western Blot**

Para esta técnica, el gel de SDS-PAGE, tras la electroforesis en las condiciones descritas en la sección anterior, fue sometido a un proceso de transferencia de las proteínas a una membrana. Para ello, se realizó una **electrotransferencia húmeda** de las proteínas de los geles de interés a una membrana de PVDF (Inmobilon-FL, Merck Millipore) de 0,45  $\mu$ m de poro (activadas previamente con metanol durante 5 minutos), mediante el sistema TransTurbo (Bio-Rad). Una vez fijadas las proteínas a la membrana, esta fue incubada durante 5 minutos en Blocking Buffer (EveryBlot Blocking Buffer, BIO-RAD), para bloquear las membranas. A continuación, se añadió el **anticuerpo primario** conjugado a la enzima **HRP** (peroxidasa de rábano), por lo que no es necesario el uso de anticuerpo secundario. Se utilizó el anticuerpo monoclonal His-Tag H-3 8036 de ratón (IgG, Santa Cruz Biotechnology), que reconoce la cola de histidinas. La membrana se incubó con el anticuerpo a una dilución 1:1000 durante 1 hora, con oscilación basculante, a temperatura ambiente. Posteriormente se realizan 3 lavados de 5 minutos

con Washing Buffer (0,02 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 0,1 % Tween-20). Por último, una incubación de 5 minutos con una mezcla 1:1 de sustrato quimioluminiscente (SuperSignal™ West Pico PLUS, ThermoScientific), seguida de un revelado mediante transiluminador.

### 3.6. Técnicas de clonaje

#### 3.6.1. Amplificación de DNA por PCR

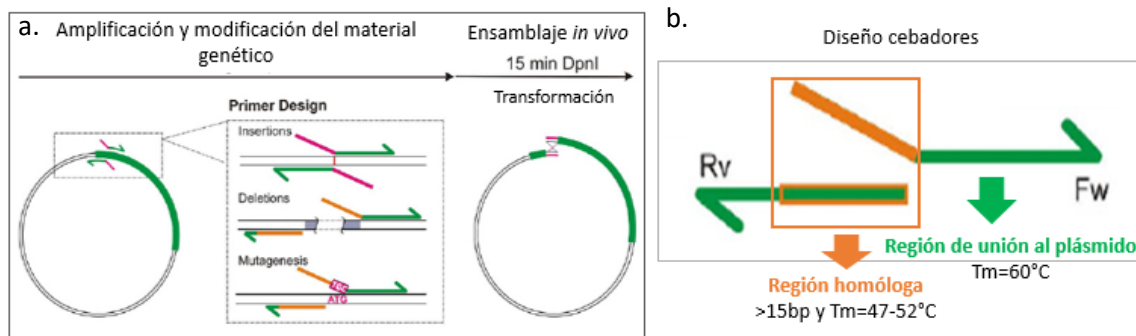
La amplificación de fragmentos específicos de interés se llevó a cabo mediante la **reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**. El volumen final de reacción fue de 25  $\mu$ L en todos los casos. Para ello, se generó una solución Master Mix (PCR Master Solution), en tubos de 200  $\mu$ L, cuya composición exacta se recoge en la *tabla A.3, Anexo 2* (programa de PCR *Figura A.5*). Se le añadió 1 ng de DNA molde (en este caso, DNA plasmídico), y 0,2  $\mu$ M de cada cebador (el directo y el reverso), y se introdujeron en un termociclador MiniCycler (MJ Research), en el que se especifica el programa correspondiente. En el *Anexo 1* se recogen los mapas de los plásmidos y los cebadores empleados.

Una vez terminado el programa, se verificó una correcta amplificación mediante **electroforesis en gel de agarosa** al 1 % en tampón TB 0,5x (44 mM Tris-HCl y 44 mM ácido bórico, suplementado con la sonda SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen)), durante 15 minutos, a un potencial de 150 V. Se observó el gel empleando el transiluminador.

Confirmada la amplificación del fragmento de interés, se llevó a cabo una digestión del producto de PCR mediante la endonucleasa **DpnI** (FastDigest, ThermoFisher), para degradar el DNA parental metilado (15 minutos a 37 °C).

#### 3.6.2. IVA Cloning

Para realizar todos los clonajes necesarios, se utilizó la técnica IVA cloning (*In Vivo Assembly*), que utiliza una vía de recombinación independiente de recA en cepas comunes de *E. coli* para ensamblar fragmentos de DNA dentro de células vivas, sin necesidad de ensamblajes mediante enzimas de restricción (García-Nafría *et al.*, 2016). Se utilizó en este caso para la introducción de genes sintéticos en plásmidos comerciales, para la eliminación de fragmentos de los plasmidos y para la introducción de una mutación puntual. En todos los casos, fue necesario un primer paso de PCR donde se emplearon cebadores específicos, que deben seguir unas especificaciones, recogidas en la *figura 9*.



**Figura 9. Esquema IVA-Cloning.** (a) Explicación esquemática del funcionamiento de la técnica. (b) Especificaciones del diseño de los cebadores a emplear, Fw y Rv hacen referencia a los cebadores directo (Fw, Forward) y reverso (Rv, Reverse), respectivamente. Imagen adaptada del artículo elaborado por García-Nafría et al., 2016.

Una vez terminada la PCR y degradado el DNA metilado parental, el producto (que debe añadirse simultáneamente al gen sintético que se desea insertar, si es el caso) se introduce en cepas de *E. coli* XL10-Gold electrocompetentes mediante transformación por choque térmico. Se añadió 6  $\mu\text{L}$  de DNA (en el caso de introducción de un gen sintético, 1  $\mu\text{L}$  del fragmento a insertar y 3  $\mu\text{L}$  del producto de PCR) en 100  $\mu\text{L}$  de stock de células. Una vez incorporado el DNA en las cepas *E. coli* XL10-Gold, se producirá la **recombinación homóloga** entre los extremos homólogos del plásmido (y el gen sintético, en su caso) empleando la maquinaria celular de la bacteria. La selección de las colonias positivas se realiza mediante plaqueo del cultivo en una placa de LB-Agar, suplementada con el antibiótico adecuado.

La extracción del DNA plasmídico se llevó a cabo usando un kit de **MiniPrep** en esterilidad (NZYMiniprep, NZYtech), siguiendo los pasos pautados por el protocolo de la casa comercial.

En algunos casos, se verificó la eficacia del proceso mediante un ensayo con **enzimas de restricción** (kit FastDigest, ThermoFisher), digiriendo 1  $\mu\text{g}$  de DNA plasmídico con combinaciones de enzimas escogidas estudiando el mapa de restricción, y comprobando el resultado mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Se cuantificó la cantidad de DNA obtenido, midiendo su absorbancia a 260 nm en un sistema **Nanodrop** (NanoDrop™One Serie DS-11; DeNovix, Wilmington, Delaware, EEUU), y se realizó posteriormente una **secuenciación** del plásmido mediante el método Sanger externamente, en la empresa Macrogen (Madrid, España).

### 3.7. Técnicas de cultivo celular eucariota

Para el trabajo con cultivos celulares eucariotas se empleó una cabina de flujo laminar de **bioseguridad 2**, bajo condiciones de esterilidad. Todo el material empleado (como las puntas y microtubos) fue esterilizado mediante autoclave, añadiendo un paso de limpieza previa a la introducción en campana con etanol al 70 % de todos los objetos.

### 3.7.1. Transfección

Los ensayos de transfección celular se realizaron en placas de 8 pocillos  $\mu$ -Slide (IBIDI), así como en placas de cultivo estándar de 96 y de 24 pocillos (ThermoScientific). En estas placas de 24 pocillos se introdujeron cubreobjetos de vidrio, para poder realizar una fijación y montaje en portaobjetos, cuando procedía. Previamente a la siembra, se realizó un tratamiento con **Poly-D-lisina** (PDL, Gibco, A3890401), un polímero sintético con propiedades catiónicas que permite una mejor fijación de las células al vidrio o plástico, gracias al establecimiento interacciones con las moléculas negativas de la superficie de las membranas celulares. Este polímero se deja actuar durante un mínimo de 30 minutos (incubando en la estufa a 37 °C), y se retira, tras lo que se lavan las superficies dos veces con DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline), suplementado con  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . Se sembraron las células a una densidad final de  $1,25 \cdot 10^4$  células/cm<sup>2</sup> y se incubaron 24 horas antes de proceder con la transfección.

Con el objetivo de poner a punto la transfección del **plásmido de irisina** en células **eucariotas**, se realizó la transfección del material plasmídico (recogido en el *apartado 3.4*) utilizando 3 reactivos de transfección diferentes, Lipofectamina 2000 (Invitrogen), PEI Max (Polysciences) y JetOPTIMUS (PolyPlus). En los tres casos, se empleó 0,5  $\mu\text{g}$  de DNA, mediante un ratio DNA:reactivo 1:4, 1:3 y 1:3, respectivamente. Los tres reactivos utilizados se basan en polímeros o lípidos catiónicos, que forman complejos con el DNA mediante interacciones electrostáticas, facilitando la fusión con la membrana celular. En todos los casos se siguieron los pasos pautados por el protocolo facilitado por cada casa comercial.

También se realizó la **transfección de fibras de  $\alpha\text{S}$**  (10 nM de solución de fibras generadas in vitro), bien con el agente de transfección escogido (siguiendo el protocolo facilitado por la casa comercial) o bien sin ayuda de agentes de transfección, ya que existen evidencias en la literatura de la capacidad de las fibras de atravesar la membrana celular sin necesidad de agentes externos (27).

### 3.7.2. Preparación de la solución de fibras amiloides de $\alpha\text{S}$

Dentro del grupo de investigación de la Dra. Cremades, se lleva a cabo la generación de fibras amiloides mediante la incubación de monómeros de  $\alpha\text{S}$ , en este caso tanto etiquetados con el fluorocromo Atto647N como sin marcaje fluorescente, mediante una incubación a 37 °C durante 3 días, en una solución específica (PBS 25 mM (pH 7,4); NaCl 5M; Azida sódica 0,02%), que provoca el **auto-ensamblaje** de estas fibras. Previo a su adición a los cultivos celulares, es necesario realizar tres lavados con PBS, centrifugando 20 minutos a 14000 rfc entre los mismos, y cuantificando la concentración mediante espectrofotometría UV-Vis.

Como parte de este proyecto, se optimizó el tratamiento de **sonicación** y **fragmentación** de la solución de fibras previa a su adición a las células. Se tomaron alícuotas de estas fibras y se sometieron a diferentes procesos de fragmentación por



ultrasonidos en baño. Se utilizaron tres condiciones de sonicación de la solución de fibras para determinar la condición más óptima que permita utilizarlas como modelo de estudio de elongación fibrilar en el interior celular. Para ello se utilizó el sonicador UntrasoundH-D Selecta P y el sonicador ElmasonicP a una frecuencia de 37 y 80 kHz, respectivamente. Para estudiar la longitud de la misma, se llevó a cabo una cuantificación de la longitud medida de las fibras en cada condición tras el protocolo de sonicación por microscopía electrónica de transmisión (TEM, apartado 3.8.2)

### 3.7.3. Evaluación de la citotoxicidad de la irisina mediante el ensayo de la resazurina.

Para estudiar cómo afecta la expresión de la irisina a la **viabilidad** de un cultivo celular, se utilizó el ensayo de resazurina (7-hidroxi-10-oxidofenoxazina-10-ilo-3-ona, Canvax). Este método se basa en la monitorización del cambio colorimétrico de la resazurina al sufrir una reducción por parte de las células vivas, de manera que sirve como indicador cuantitativo de la viabilidad celular de un cultivo, a través de la medida de su actividad metabólica. Las células vivas son capaces de reducir la **resazurina**, de color azul y con un máximo de Absorbancia de 600 nm, a **resofurina**, rosa, con el máximo de absorbancia en 570 nm.

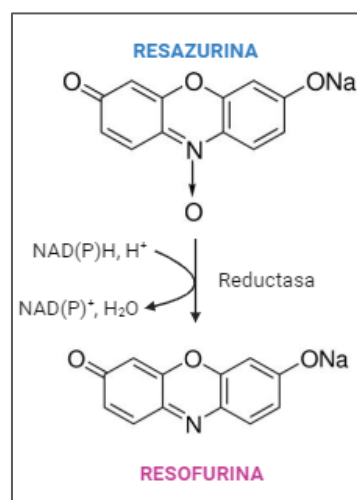


Figura 10. Conversión de resazurina a resofurina. Imagen creada con BioRender

## 3.8. Microscopía

### 3.8.1. Microscopía confocal de fluorescencia

Esta técnica se empleó para el estudio de los cultivos celulares, tanto por imagen *in vivo* realizando un proceso de tinción previa de los núcleos (empleando 100 µg/mL de Hoechst 33342 y una incubación de 10 minutos), como a tiempo final mediante un proceso previo de **fijación con paraformaldehído** (PFA) al 2 % en PBS (montaje de los cubreobjetos en portaobjetos utilizando el medio de montaje Prolong Gold antifade).

Se analizaron las muestras utilizando un **microscopio de fluorescencia invertido** Leica DMI6000B (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) acoplado a una unidad de control de experimentos en tiempo real ViRTEx (VisiTron Systems GmbH, Puchheim, Alemania) y a un iluminador de diodo láser LDI-4 (89 North, Williston, VT, EE. UU.). Las muestras se iluminaron con cuatro líneas láser de **405, 470, 555 y 640 nm** para la excitación de los núcleos marcados con **DAPI**,  $\alpha\text{S}$  marcado con **YFP**, irisina marcada con **mCherry** y las fibras de  $\alpha\text{S}$  marcadas con **Atto647N**, respectivamente. La emisión pasó a través de una unidad de disco giratorio X-Light V2 (CrestOptics, Roma, Italia), generando la confocalidad. Se recogieron al menos 3 imágenes de 340×340 µm para cada muestra

con el software de imagen VisiView (Visitron Systems GmbH, Puchheim, Alemania) enfocando a la altura indicada sobre el fondo del pozo, y se analizaron con ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EE. UU.).

Filtro	Excitación	Dicroico	Emisión
YFP	470/40 nm	500 nm	525/50 nm
mCherry	560/40 nm	595 nm	645/75 nm
Atto647N	620/60 nm	660 nm	700/75 nm

Tabla 4. Paso de banda de los diferentes cubos de fluorescencia empleados para la visualización de las proteínas fluorescentes correspondientes

### 3.8.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Se empleó esta técnica con el objetivo de **cuantificar** la **longitud** de las **fibras de  $\alpha$ S** tras ser sometidas a los diferentes procesos de sonicación recogidos en el apartado 3.7.2.

Para llevar a cabo este ensayo, es necesaria la preparación de *grids* o soportes de **tinción negativa**, cubiertos de una capa muy fina de carbono amorfo (CF400-CU, Electron Microscopy Science), que se sometieron a un proceso llamado *glow discharge*, para convertirla en hidrofílica, que consiste en una descarga de plasma en el vacío de 30 segundos a 15 mA (Leica AM).

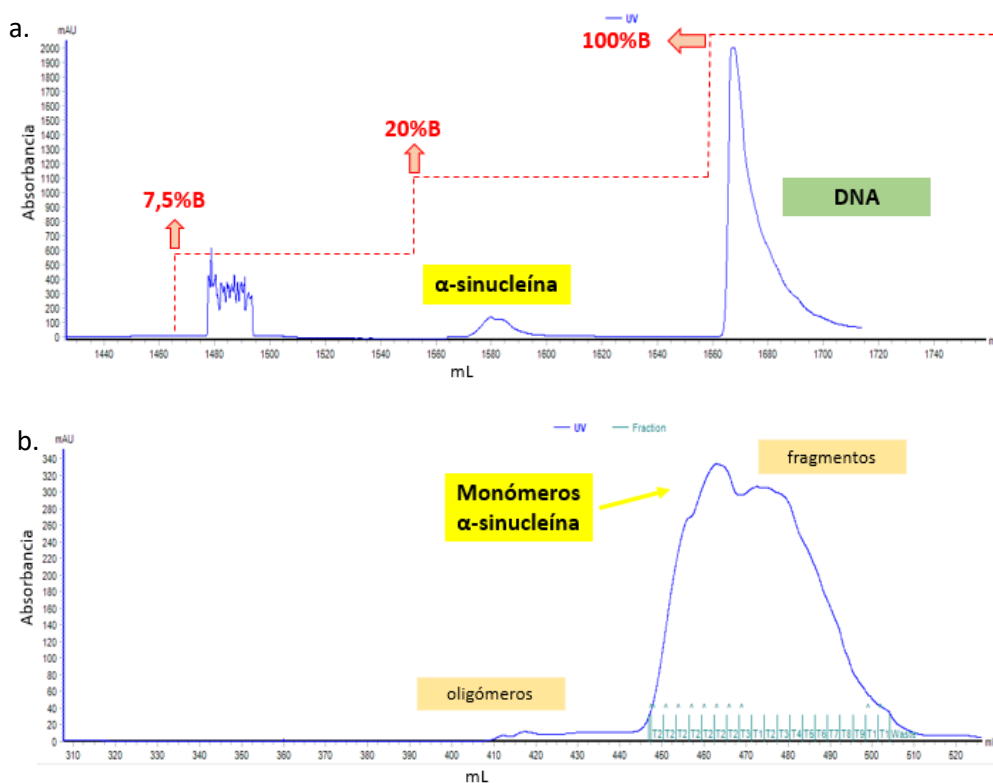
Sobre estos soportes se añadieron la solución de fibras, a una concentración de 10 nM, que se dejaron fijar durante un minuto. Después, tras 3 lavados consecutivos de las grids con agua MiliQ, se realizó una tinción con acetato de uranilo al 1%. El motivo de emplear este metal pesado es su capacidad de unirse de manera selectiva a estructuras celulares, formando un revestimiento fino y uniforme alrededor de las mismas, que confiere un contraste negativo alrededor de las estructuras y permite la visualización de las mismas mediante microscopía electrónica de transmisión. En este caso, se empleó el microscopio electrónico de transmisión Tecnai T20, acoplado a un cañón LaB6, de tipo termoiónico. Se utilizó una dosis de 80 electrones/Å<sup>2</sup> durante 0.5 segundos con un defoco de -1  $\mu$ m.

El análisis de las imágenes de las fibras sonicadas fue realizado mediante el software ImageJ, generando una serie de datos, que fueron procesados por GraphPad Prism 8.0.1.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Purificación de $\alpha$ S

El estudio comenzó con la expresión y purificación de  $\alpha$ S recombinante en cepas de *E. coli* BL21 con el fin de familiarizarme con técnicas de purificación de proteínas, a la vez que obtener un stock de  $\alpha$ S con el que generar fibras amiloides *in vitro*. El objetivo inicialmente era probar la capacidad de la irisina de inhibir la elongación de fibras de  $\alpha$ S en ensayos *in vitro* estándar ya optimizados en el grupo de investigación. Los **protocolos** de purificación de  $\alpha$ S recombinante han sido **previamente optimizados** en el grupo, y los resultados de los dos últimos pasos de cromatografía del proceso de purificación se muestran en la *figura 11*.



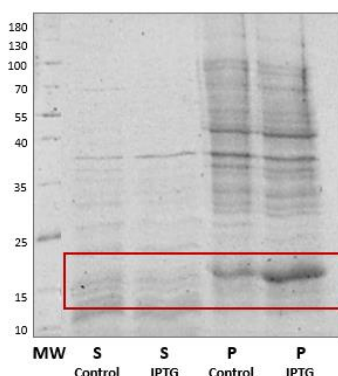
**Figura 11. Cromatogramas obtenidos en el proceso de purificación de la  $\alpha$ -sinucleína.** (a) Columna de intercambio aniónico (b) Columna de exclusión molecular. Los cromatogramas muestran la medida de absorbancia (a 280 nm) en función del volumen de elución (mostrado en mL), pudiéndose identificar las fracciones de volumen donde eluyen macromoléculas que absorben a 280 nm. Tras analizar dichas fracciones por electroforesis, se localizan las fracciones donde se encuentra la proteína de interés.

El gradiente de elución de la cromatografía de intercambio iónico se realizó en **modo de escalera**, incrementando los porcentajes de tampón B como se muestra en la *figura 11a*. En el primer incremento de concentración sal al adicionar tampón B, correspondiente a **7,5 %** (ver *sección 3.3 de Métodos* para una descripción de la composición del mismo, así como del protocolo de purificación en detalle), eluye **proteínas** unidas a la columna de manera **inespecífica**. En el siguiente incremento a **20 %** de tampón B, se eluye  **$\alpha$ S**, motivo por que se recogen las fracciones que comprenden al volumen de elución entre 1570 y 1595 mL. EL pico de absorbancia observado al

umentar al **100 %** de tampón B corresponde con **DNA residual** de la muestra. La identidad de cada pico se comprobó mediante electroforesis en gel SDS-PAGE. Las fracciones recogidas que contienen  $\alpha S$ , se dializaron y concentraron para cargarlas en una columna de exclusión molecular, con el fin de separar la fracción monomérica de la proteína de agregados (oligómeros) y fragmentos de la misma.

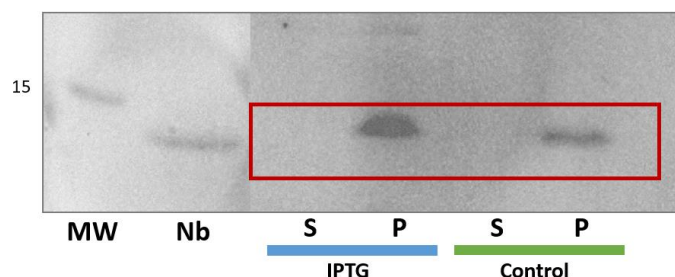
#### 4.2. Prueba de sobreexpresión de irisina en cepas de *E. coli*

Con el objetivo de realizar ensayos *in vitro* de interacción de la proteína irisina con  $\alpha S$ , se estableció un plan para optimizar la expresión y purificación de irisina de forma recombinante en *E. coli*, ya que este trabajo supone el primer intento de trabajar con esta proteína en el grupo de investigación de la Dra. Cremades. Hasta la fecha existen un par de artículos científicos que reportan su expresión y purificación de forma recombinante en diferentes cepas de *E. coli* (4,5), por lo que inicialmente se establecieron pruebas de expresión basadas en estos artículos usando la cepa de *E. coli* BL21. La metodología de este experimento se recoge en el apartado 3.4.; el resultado en la figura 12, en forma de gel de electroforesis desnaturizante SDS. Para poder deducir cualquier conclusión del mismo, es necesario tener en cuenta que la irisina tiene un peso molecular de 12 kDa, aunque la adición de una cola de 6 histidinas y sitios de corte de proteasas para su eliminación, provocan un aumento del peso del constructo a 15 kDa. Se puede observar que, en los carriles correspondientes a muestras del sobrenadante, no se reconoce una banda de sobreexpresión a la altura de peso molecular esperada, mientras que, en los carriles donde se añadieron las fracciones de pellet, tanto del cultivo en el que se añade inductor como en el que no (denominado "Control", de aquí en adelante), se observa una banda cuya intensidad y peso molecular podría corresponder con la sobreexpresión de irisina, también se reconoce mayor expresión en la muestra inducida con IPTG. Estos resultados sugieren que la irisina no se encuentra en forma soluble en estas condiciones, y cae en la fracción insoluble al centrifugar el extracto crudo tras la lisis celular.



**Figura 12. Prueba de expresión de la irisina en *E. coli* BL21.** Imagen de un gel de poliacrilamida al 15%, obtenido mediante SDS-PAGE y teñido con azul de Coomassie. Los carriles aparecen etiquetados como S o P, en función de si la muestra que contienen se trata del sobrenadante o el pellet, respectivamente, las siglas MW hacen referencia al marcador de peso molecular, aparecen especificados los pesos correspondientes de cada una de las bandas en kDa, a la izquierda. Un recuadro granate indica la altura del gel en el que se localiza la proteína sobreexpresada.

Para confirmar la presencia de esta proteína, al obtener resultados tan desconcertantes (sorprende tanto la ausencia de proteína soluble como la fuerte expresión de proteína en la muestra que carece de inductor), se recurrió a la técnica de Western Blot, utilizando un anticuerpo anti-His (anti cola de histidinas). Como control positivo, se incluyó una muestra de un nanoanticuerpo (Nb, nanobody) utilizado por el grupo, que tiene también una cola de 6 histidinas y un peso molecular de 13,42 kDa. Se observa el resultado en la *figura 13*.



**Figura 13. Resultado del Western Blot de la prueba de expresión de irisina en BL21.** En orden de aparición: marcador de peso molecular (MW), nanoanticuerpo (Nb), sobrenadante y pellet (S y P) de la muestra inducida con IPTG, y a continuación de la muestra control, sin IPTG. Se muestra sólo la parte del gel correspondiente a la banda del marcador molecular en torno a 15 kDa.

De esta figura se extrae la conclusión de que, efectivamente, existe una sobreexpresión de la proteína de interés, y esta se encuentra a la altura esperada en el gel de SDS-PAGE, pero la proteína se encuentra **únicamente en la fracción insoluble** (pellet). Lo más sorprendente, a nuestro juicio, es que la proteína ha sido previamente expresada y purificada de la forma soluble en cepas de *E. coli* BL21 (21), aunque en nuestras manos la fracción de irisina en la fracción soluble es despreciable.

#### 4.2.1. Ensayos de solubilización

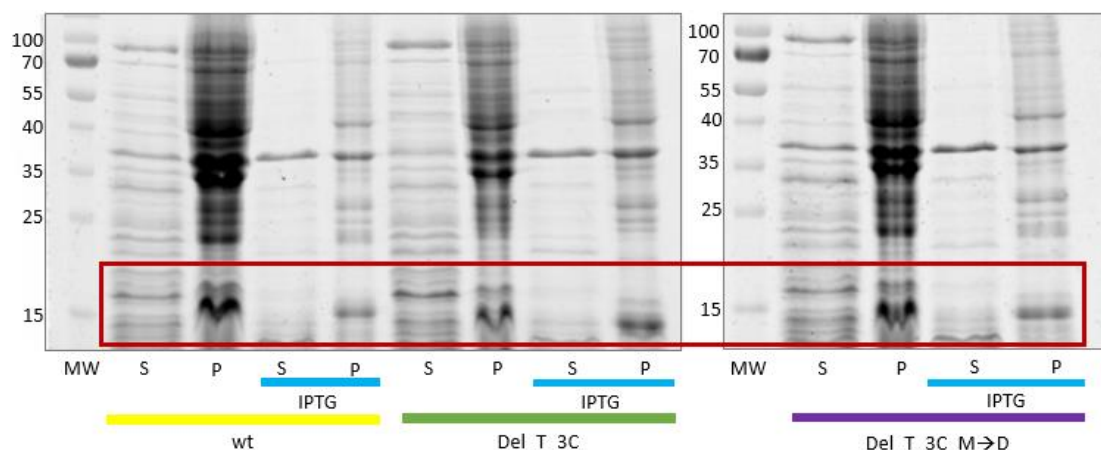
Tras el resultado anterior, se llevaron a cabo pruebas de expresión de la proteína recombinante **en otras cepas de *E. coli***, con el objetivo de identificar alguna cepa en la que la proteína tuviese una presencia mayor en la fracción soluble. Además, se diseñaron otras **variantes del plásmido** de expresión de la irisina. Primero, se eliminaron los sitios de corte de las dos proteasas, **trombina** y **3C**, que comprenden los aminoácidos **LVPRGSHMLEVLFQPH** (coloreados respectivamente), ya que esta región es una zona muy rica en residuos hidrofóbicos. De hecho, en un estudio anterior reportaron un aumento de la solubilidad de la proteína al eliminar estos sitios de corte (28). Al mismo tiempo, se llevó a cabo un clonaje paralelo, en el que además de eliminar los sitios de corte de las proteasas, se sustituía en la posición del primer aminoácido de la proteína, el residuo metionina (M) que contenía el gen sintético, por aspártico (D), primer aminoácido real de la secuencia de proteína humana tras su corte proteolítico. De esta manera, se obtenía una proteína de fusión con una cola de histidinas en el N-terminal seguido de un tripéptido SSG y la secuencia de irisina humana (sin metionina en el N-terminal). Ambos plásmidos fueron generados mediante la técnica de *IVA-Cloning*, tal y

como se explica en el apartado 3.6.2. de *materiales y métodos*, obteniendo los constructos recogidos en la *figura 14*. Los plásmidos y cebadores empleados se recogen en los apartados 1.3 y 1.4 del Anexo 1)

<b>Constructo original (wt)</b>	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMLEVLFQGHMSPAPVNVTVRHLKANS AVVSWDVLDEVVIGFAISQQKKDVRMLRFIQEVNTTTRSCALWDLEEDTE YIVHVQAISIQQSPASEPVLFKTPREAEKMASKNKDEVMTK
<b>Delección del sitio de corte de la trombina y 3C</b>	MGSSHHHHHHSSGMSPAPVNVTVRHLKANSAVVSWDVLDEVVIGFAIS QQKKDVRMLRFIQEVNTTTRSCALWDLEEDTEYIVHVQAISIQQSPASEPV LFKTPREAEKMASKNKDEVMTK
<b>Delección del sitio de corte de la trombina y 3C, sustitución M1D</b>	MGSSHHHHHHSSGDSPAPVNVTVRHLKANSAVVSWDVLDEVVIGFAIS QQKKDVRMLRFIQEVNTTTRSCALWDLEEDTEYIVHVQAISIQQSPASEPV LFKTPREAEKMASKNKDEVMTK

**Figura 14. Constructos expresados en *E. coli* durante el proyecto.** Aparece resaltada en gris la fracción de la secuencia perteneciente a la irisina, en rosa, la cola de 6 histidinas, en morado, el sitio de corte de la trombina, y en azul, el sitio de corte de la proteasa 3C.

Una vez generados los plásmidos de interés, se llevó a cabo una segunda prueba de expresión, en las mismas condiciones anteriormente probadas (inducción con 1 mM de IPTG a 28 °C O/N) para los tres plásmidos. Los resultados del análisis por electroforesis en geles SDS-PAGE se muestran en la *figura 15*.



**Figura 15. Análisis de la expresión de los diferentes constructos de irisina en *E. coli* BL21 a 28 °C durante 15 h.**

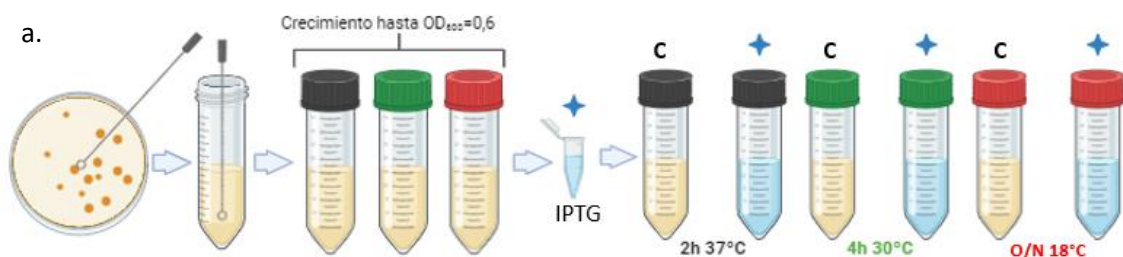
Geles de poliacrilamida al 15% obtenidos mediante una electroforesis SDS-PAGE. Para todas las condiciones aparecen muestras de los sobrenadantes (S) y pellets (P) de los controles y las muestras inducidas por IPTG (en azul), tanto para la cepa transformada con el plásmido wt (resaltado en amarillo), la transformada con el plásmido en el que se elimina el sitio de corte de la trombina y la 3C (resaltado en verde) y la cepa transformada con el plásmido en el que se realiza la delección anterior y la sustitución de M1 por D1 (en morado). Un recuadro granate indica la altura a la que aparece irisina en los geles

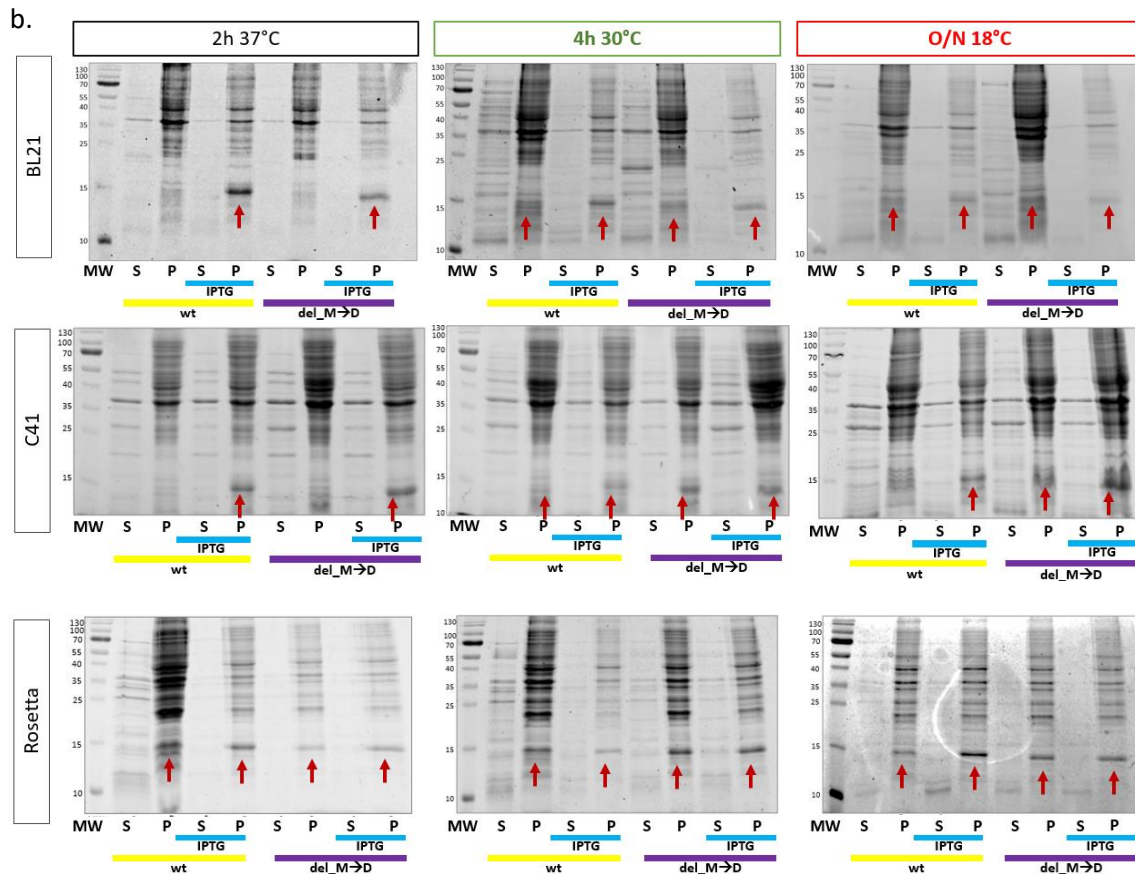
Se aprecia que, en todos los casos y tanto en ausencia como en presencia del inductor, existe una banda correspondiente al peso molecular de la **irisina en la fracción insoluble** (pellet), indicando que las diferentes versiones de la proteína forman agregados o interaccionan fuertemente con componentes de la fracción insoluble de las células. Cabe destacar también que en todos los casos la concentración de proteínas tanto en la fracción soluble como en la fracción insoluble es significativamente mayor en los casos en los que no se indujo la sobreexpresión de la proteína adicionando IPTG.

Esto sugiere que la sobreexpresión de la proteína de fusión en las tres variantes (wt, del\_T\_3C y del\_T\_3C\_M-1D) podría ser **tóxica** para la cepa de *E. coli* BL21 y, por tanto, hay una menor densidad celular con respecto a los cultivos sin IPTG.

Ante la inefectividad de esta estrategia, se optó por utilizar otras cepas de *E. coli*, la C41 y Rosetta pLysS. (29) ***E. coli* C41** es una cepa empleada frecuentemente para la expresión de proteínas recombinantes que pueden resultar tóxicas para la bacteria, debido a que presenta mutaciones adaptativas en su genoma que le otorgan tolerancia a la toxicidad proteica, reduciendo la degradación de proteínas recombinantes expresadas y optimizando la estabilidad de las mismas. Por otra parte, ***E. coli* Rosetta (DE3)pLysS** contiene un plásmido que permite la expresión de codones poco comunes en cepas corrientes, como son AUA, AGG, AGA, CUA, CCC y GGA, de manera que es también frecuentemente utilizada para la expresión de proteínas recombinantes problemáticas. Se utilizó ***E. coli* BL21** a modo de control, y en las tres cepas se estudió la expresión del plásmido silvestre y el que presenta la delección de los sitios de corte de las dos proteasas y sustitución de la metionina por aspártico.

Se testaron de manera simultánea, además, **tres condiciones de inducción** diferentes: 2h de inducción con IPTG a 37 °C, 4h de inducción con IPTG a 30 °C, y una última O/N a 18 °C. Para ello, se generó un preinóculo a través de una única colonia transformada de cada cepa como punto de partida de los tres cultivos que crecerán de manera paralela, hasta alcanzar una  $OD_{600} \approx 0,6$ ; momento en el que cada cultivo se divide en dos fracciones idénticas. A una fracción se le añadió inductor (IPTG 1 mM), y a la otra no, a modo de control. Ambas fracciones fueron incubadas a una condición dada, tras lo cual fueron analizadas de forma simultánea como se ha explicado anteriormente. Cabe destacar que, en este análisis, previamente al paso de sonicación, se llevó a cabo un pesaje de todos los pellets celulares obtenidos, para realizar una resuspensión en urea 6 M en un volumen que llevase a una concentración de extracto celular similar en todas las condiciones. Los pesos de los pellets y el volumen correspondiente en el que se resuspendieron se encuentran recogidos en el *Anexo 4, tabla A.5*. Los resultados de esta prueba se exponen a continuación, en la *figura 16*.





**Figura 16. Resultado de la prueba de solubilización de irisina recombinante en tres cepas de *E. coli*.** (a) Esquema del experimento. (b) Resultados. De izquierda a derecha, se presentan los resultados de la condición de inducción 2 h a 37 °C, 4 h a 30 °C y O/N a 18 °C, y de arriba abajo, *E. coli* BL21, C41 y Rosetta pLyss. En cada uno de los gels, los carriles que contienen muestras de sobrenadante se marcan con una S, y los que contienen pellet, con una P. Aparecen marcadas las muestras pertenecientes al plásmido *wild type*, wt, en amarillo, y al plásmido mutado, en morado. Para cada uno de estos casos, existe una pareja de muestras, pertenecientes al cultivo control, y al que se le añade IPTG, en azul. Las flechas granates indican la banda correspondiente a la irisina.

En ninguna de las cepas de *E. coli* utilizadas se aprecia una fracción de proteína significativa en la fracción soluble tras la sonicación para ninguno de los plásmidos analizados. El motivo más probable de la pérdida de solubilidad de esta proteína está relacionado con la **ausencia de glicosilación** de la proteína cuando ésta se expresa en *E. coli*, ya que se ha descrito que la proteína cuando se expresa en mamíferos está altamente glicosilada y se han identificado dos motivos *NXT* de glicosilación (21). Según nuestros resultados, la proteína es altamente insoluble en ausencia de estas modificaciones postraduccionales, inviábiles en bacterias.

Por este motivo, se deshecha la posibilidad de realizar una purificación de la proteína empleando cultivo de *E. coli*. Una posible solución podría haber resultado en la utilización de células de mamífero para la expresión de la proteína y su posterior purificación, pero debido a los altos costes y bajos rendimientos de esta metodología, se optó por redirigir el proyecto hacia un enfoque *in cellulo*, recogido en los siguientes apartados.



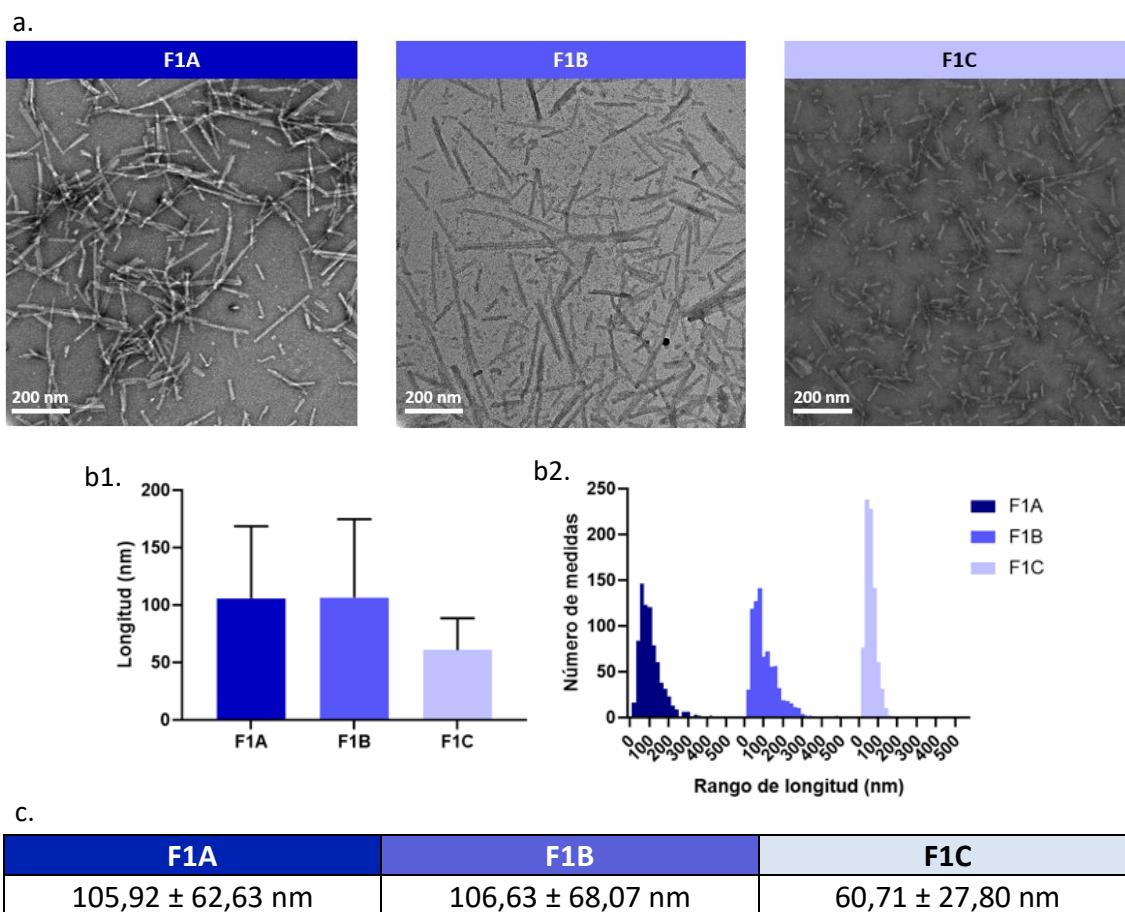
### 4.3. Ensayos de elongación de fibras de $\alpha$ S *in cellulo*

#### 4.3.1. Generación de fibras, sonicación y medida mediante TEM

Es bien sabido que tanto la internalización de las fibras en las células como la eficiencia de elongación de las fibras por adición de monómeros en los extremos de éstas son procesos dependientes del tamaño medio de las fibras; siendo ambos procesos más favorables cuanto más cortas son las mismas (30). La manera más eficiente de acortar las fibras amiloides, una vez generadas *in vitro*, es mediante sonicación (33). Compañeros del grupo de investigación generaron fibras amiloides *in vitro* utilizando  $\alpha$ S WT y un mutante en el que se introdujo una cisteína para su etiquetado con sondas fluorescentes de forma covalente por reacción de maleimida. De esta manera se dispuso de muestras de fibras con  $\alpha$ S marcada con el fluorocromo **Atto647N** (máximo de excitación a 645nm y de emisión a 669 nm) al 20 % (80 % de  $\alpha$ S es WT, sin sonda fluorescente). Esta solución de fibras fue sometida a diferentes procesos de **sonicado** y métodos de **transfección** (concretamente diferentes agentes de transfección) con el objetivo de optimizar el protocolo experimental de elongación de fibras de  $\alpha$ S *in cellulo*. Las fibras generadas son el resultado de un proceso de elongación de fibras *in vitro* generadas previamente de un proceso de generación de fibras *de novo* (de  $\alpha$ S monomérica). A las fibras generadas *de novo* se les denomina fibras de generación cero (**F0**), mientras que a las fibras generadas por elongación de fibras F0 se les denomina fibras de primera generación, **F1**, con una estructura más ordenada y con menos tendencia a formar aglomerados de fibras (*clamps*).

Con respecto a la **sonicación** de las fibras, se utilizaron **3 condiciones** diferentes: 1) sonicación con un sonicador de baño UntrasoundH-D Selecta P a una potencia de generador de 240W (condición **F1A**), 2) sonicación con un sonicador de baño ElmasonicP con una potencia máxima de 280W, al 37 kHz (condición **F1B**) y 3) sonicación con un sonicador ElmasonicP al 80 kHz de potencia (condición **F1C**). En todos los casos las muestras estuvieron 15 minutos en sonicación continua en un baño con hielo.

La **longitud** media de las fibras obtenidas tras cada tipo de sonicación se evaluó por **TEM**. Se elaboran tres rejillas de tinción negativa utilizando acetato de uranilo. Los resultados de este proceso se recogen en la *figura 16*.



**Figura 17. Resultado TEM.** (a) Imágenes representativas de cada condición de sonicación, obtenidas por TEM, la barra de escala representa 200 nm. (b1 y 2) Representación gráfica, y resultados numéricos de la media y desviación estándar de las medidas, respectivamente; (c) Histograma representativo de la frecuencia relativa y longitud de todas las fibras medidas en las imágenes de TEM para cada condición de sonicación. Las imágenes de TEM fueron analizadas mediante ImageJ y GraphPad 8.0.1

#### 4.3.2. Transfección de fibras en células HEK- $\alpha$ S-YFP

Con el objetivo de realizar un estudio de la capacidad de las células HEK293T de internalizar las fibras de  $\alpha$ S, y de esta manera, poder monitorizar el **proceso de elongación** de las mismas en in interior celular, se introdujeron fibras marcadas con el fluoróforo Atto647N y se utilizó un modelo celular de HEK293T que expresa de forma **estable** la proteína de fusión  **$\alpha$ S-YFP** (HEK293- $\alpha$ S-YFP). Como parte de la puesta a punto de los experimentos de elongación de fibras de  $\alpha$ S *in cellulo*, se incubaron las células con las fibras marcadas con dos agentes de transfección diferentes (JetOPTIMUS y PEI MAX), además de sin agentes de transfección, (27). En todos los casos se mantuvo la concentración de fibras constante a 10 nM. Tras la transfección, las células, fijadas a un cubreobjetos de vidrio, se dejaron incubar 72 h a 37 °C, tiempo tras el que se realizó un montaje de estos cubres sobre portaobjetos, utilizando medio de montaje con Prolong para la tinción de los núcleos. Se realizó una observación y toma de imágenes mediante microscopía confocal de fluorescencia. La *figura 18* muestra una imagen representativa de cada condición.

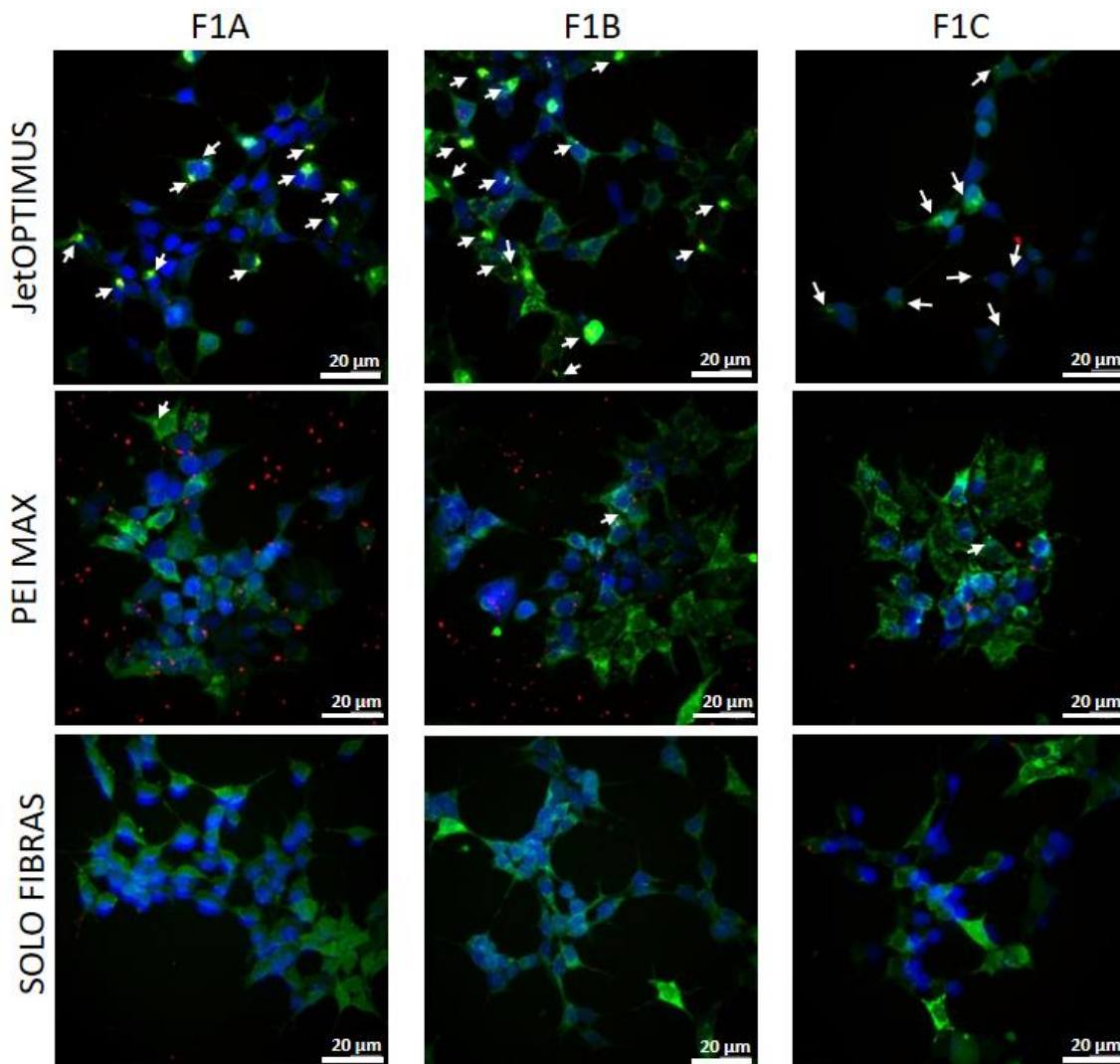
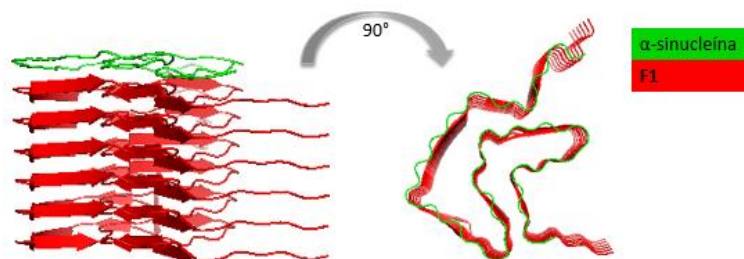


Figura 18. Internalización de fibras de  $\alpha$ S en células HEK293T que expresan  $\alpha$ S-YFP de forma estable. Recomposición de los canales pertenecientes a los láseres de 405 nm (azul, núcleos), 470 nm (verde,  $\alpha$ S-YFP) y 640 nm (rojo, fibras de  $\alpha$ S-Atto647N). Las flechas blancas muestran puntos de colocalización del canal verde y rojo (resultando en color amarillo). Barra de escala de 20  $\mu$ m, esquina inferior izquierda.

La *figura 18* muestra la yuxtaposición (*overlay*) de los 3 canales de fluorescencia analizados: los núcleos marcados con la sonda **DAPI** (excitación con el láser de 405 nm, en azul), la proteína  $\alpha$ S marcada con **YFP**, expresada de forma constitutiva por las células (excitación con el láser 470 nm, en verde) y, por último, las fibras de  $\alpha$ S marcadas con **Atto647N** (excitación con el láser 640 nm, en rojo). Indicar que del canal pertinente al DAPI, 405nm, no se puede obtener una imagen confocal, debido a problemas de reflexión del propio microscopio (en trámites de ajuste por la casa comercial), motivo por el que algunas imágenes en este canal no presentan una resolución confocal.

Al realizar la yuxtaposición del canal rojo y verde, pueden observarse puntos **amarillos**, que surgen por los **eventos de colocalización** de las **fibras marcadas** con la  **$\alpha$ S expresada por las células**, lo que indica eventos de elongación en el interior de las células HEK293T- $\alpha$ S-YFP. Un esquema del proceso molecular de elongación se muestra en la *figura 19*.



**Figura 19. Esquema del proceso de elongación propuesto en el modelo *in cellulo* desarrollado en este trabajo.** Monómeros de  $\alpha$ S (verde, marcada con YFP) presentes en las células HEK293T- $\alpha$ SYFP son capaces de incorporarse a los extremos de las fibras preformadas *in vitro* e internalizadas (rojo, marcadas con Atto647N).

Respecto a los resultados recogidos en la *figura 18*, se puede observar, a modo cualitativo, que pese a existir una diferencia de longitud notable entre las F1A/B y las F1C, no existen diferencias observables entre las diferentes fibras al utilizar un mismo agente de transfección, pero sí al utilizar diferentes modos de internalización de las fibras, apreciando un máximo de número de eventos de elongación al utilizar **JetOPTIMUS**. Estudios previos, llevados a cabo por *Yamasaki et al.* (27), describen una eficiente internalización de fibras sin necesidad del uso de un agente de transfección, pero no se especifica el tamaño de las mismas, por lo que puede que este sea un motivo para la falta de eficacia de internalización observada en este trabajo para esta condición.

#### 4.3.3. Ensayo transfección de irisina en HEK- $\alpha$ S-GFP y HEK- $\alpha$ S-YFP

Con el objetivo de testar la **expresión** de irisina por parte de las líneas celulares de HEK293T modificadas, se realiza una transfección de las mismas con el plásmido **pJac346**, que codifica para la proteína marcada con el fluorocromo **mCherry** (Em587/Em610nm), que se excita en este caso empleando un láser de **555nm**. Este experimento fue diseñado para realizar la transfección del plásmido paralelamente en dos líneas celulares derivadas de HEK293T que expresan constitutivamente  $\alpha$ S marcada con los fluorocromos YFP (**HEK- $\alpha$ S-YFP**) y GFP (**HEK- $\alpha$ S-GFP**), con el objetivo de evaluar posibles diferencias, mediante el uso del agente de transfección Jet OPTIMUS. En este caso, se siembran las células a una placa de 8 pocillos de IBIDI, con la intención de observarlas mediante microscopía confocal de fluorescencia *in vivo* a 24, 48 y 72h. Las imágenes tomadas, en particular, los canales 470nm y 555nm, se muestran en la *figura 20*.

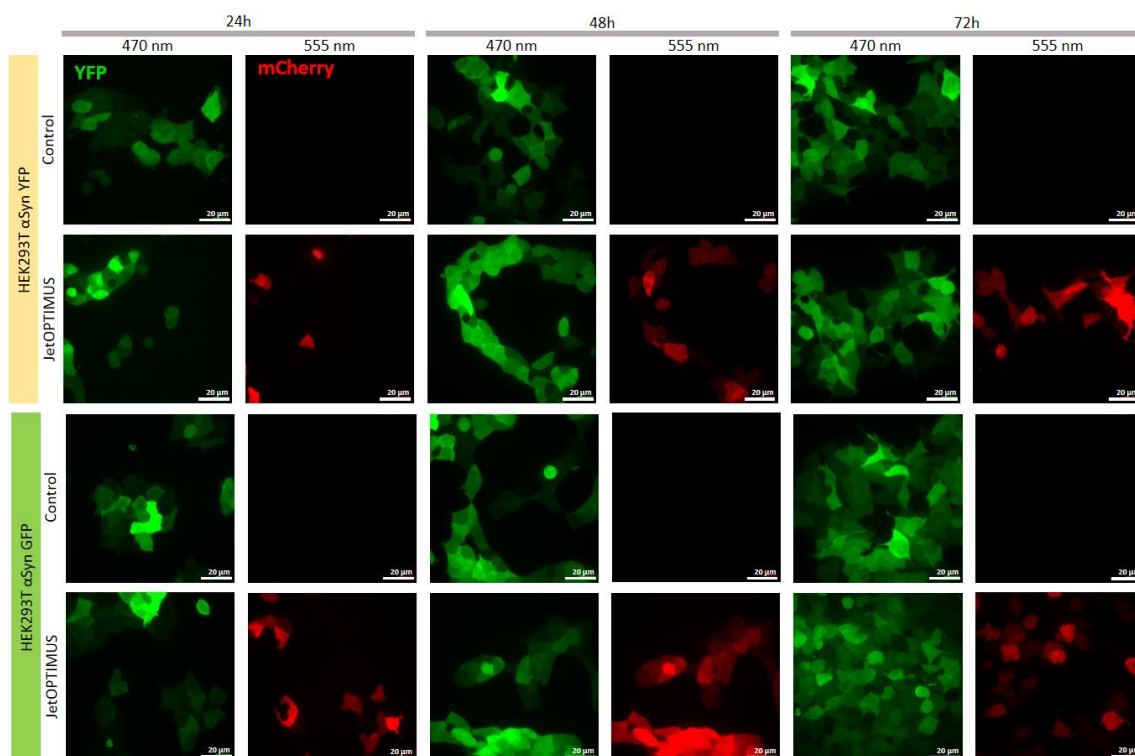


Figura 20. Resultado de la transfección del plásmido de irisina en HEK293T  $\alpha$ S YFP/GFP. Comparativa de las imágenes obtenidas en el canal del láser 470 nm o 555 nm, que revelan la fluorescencia de  $\alpha$ S e irisina, respectivamente. Barra de escala de 20  $\mu$ m, esquina inferior izquierda

Se observa una **homogeneidad** en la expresión de irisina en ambas cepas, motivo por el que se opta por realizar los experimentos siguientes con la cepa que expresa  $\alpha$ S marcada con YFP, ya que presenta una mejor capacidad de adhesión a las placas de cultivo, lo que supone una **ventaja** a la hora de su manejo en los diferentes ensayos. Destaca la presencia de punteados que sugieren **agregación** de la irisina por su sobreexpresión a las **72h**, suceso que será estudiado con más detalle en el siguiente apartado.

#### 4.3.4. Comparativa de la expresión de irisina en HEK293T y HEK $\alpha$ S-YFP, y ensayo de citotoxicidad

Con el objetivo de estudiar si la agregación de irisina observada en el apartado anterior es debida a la **coexistencia de  $\alpha$ S**, expresada constitutivamente por las células, se lleva a cabo una prueba de transfección del plásmido anterior (pJac346 irisina mCherry) paralelamente en HEK293T y HEK293T- $\alpha$ S-YFP, para comparar la tendencia de agregación en ausencia y presencia de  $\alpha$ S, respectivamente, llevando una monitorización *in vivo* a 24, 48 y 72h. Los resultados, específicamente los canales **470 nm** y **555 nm**, se muestran en la *figura 21*.

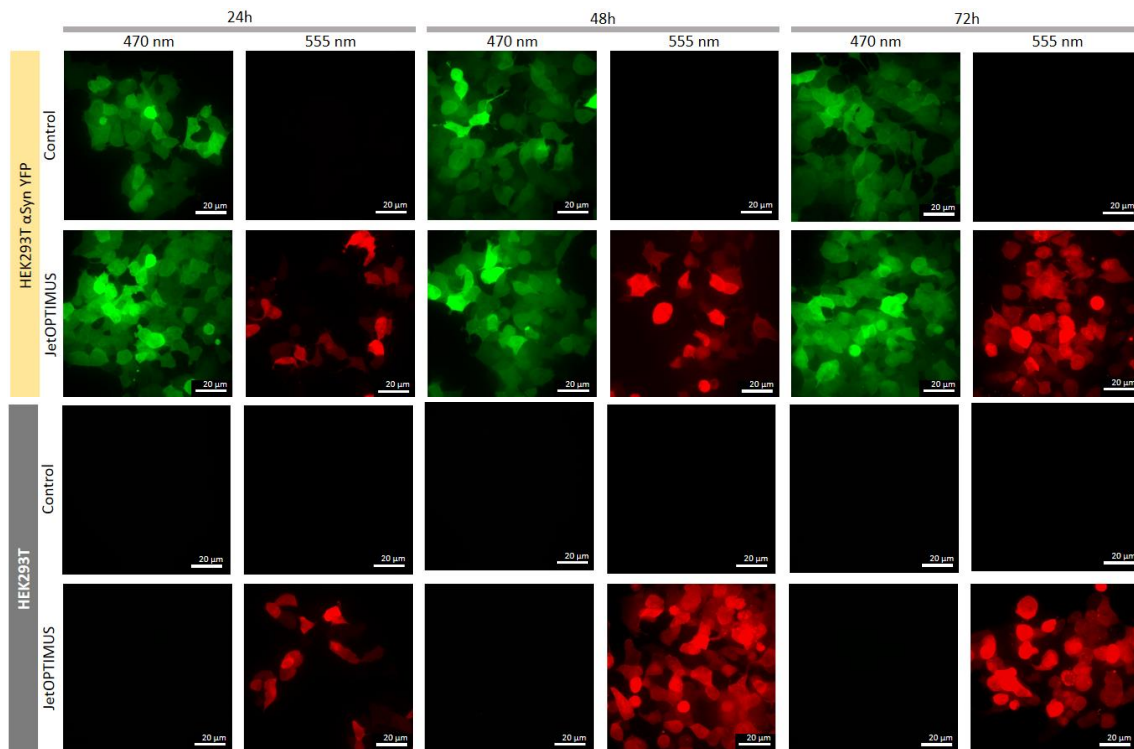


Figura 21. Resultado de la transfección del plásmido de irisina en HEK293T o HEK293T- $\alpha$ S-YFP. Comparativa de las imágenes obtenidas en el canal del láser 470 nm o 555 nm, que revelan la fluorescencia de  $\alpha$ S e irisina, respectivamente. Barra de escala de 20  $\mu$ m, esquina inferior izquierda

La aparición de punteado en la expresión de irisina a las 72h resulta consistente para ambas cepas celulares, lo que indica que **no es consecuencia de la sobreexpresión de  $\alpha$ S** (ver en mayor detalle en *figura 22*). Cabe destacar que este punteado de irisina no es apreciable a las 24 o 48 h tras la transfección.

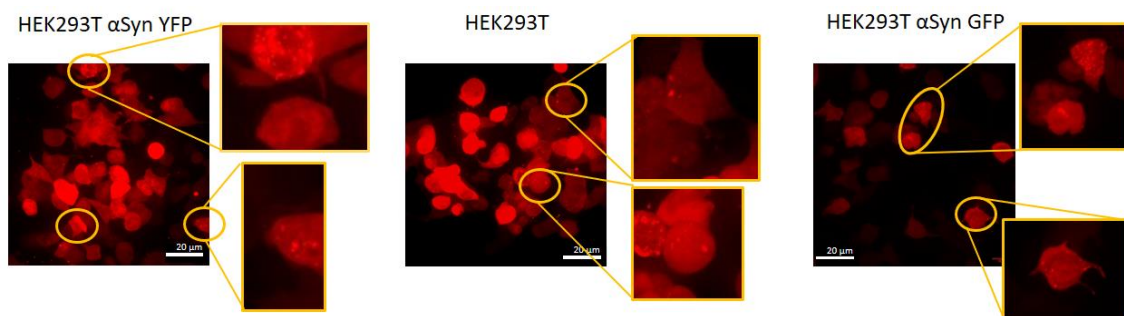


Figura 22. Imágenes representativas de la expresión de irisina pasadas 72h, en todos los cultivos celulares ensayados. Canal 555nm, la barra de escala señala 20  $\mu$ m. Círculos ámbar señalan la sección ampliada en las miniaturas, a la izquierda de cada condición.

Complementariamente a este experimento, se analiza la posibilidad del **efecto citotóxico** de irisina al transfectarla con JetOPTIMUS (en este caso, se emplea el plásmido pJac346 irisina, sin marcaje con mCherry), concretamente mediante la medida de la actividad metabólica por el método de la conversión de **resazurina** en **resofurina**. A modo de control, se cuantifica también la viabilidad celular de una muestra control, a la que no se le realiza ningún protocolo de transfección, así como de dos muestras,

transfectadas con el mismo plásmido utilizando otros dos agentes de transfección diferentes, la Lipofectamina 2000 y el PEI MAX, para descartar el efecto del propio agente de transfección en la actividad metabólica. Los resultados de esta prueba se recogen en la *figura 23*.

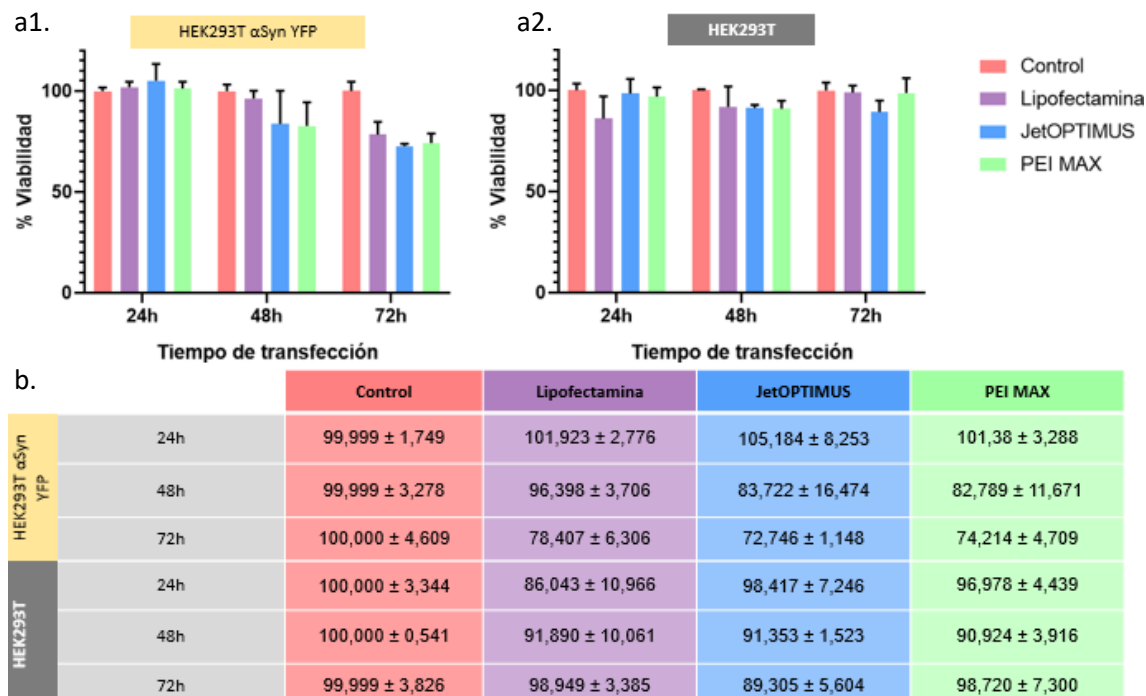


Figura 23. Resultado de la prueba de viabilidad celular de HEK293T-αS-YFP/HEK293T tras la transfección del plásmido de irisina. (a1 y a2) Representación gráfica del porcentaje de viabilidad (la columna representa el valor medio, y la barra de error la desviación típica) (b) Tabla que recoge los resultados numéricos representados en las gráficas. Generado mediante GraphPad Prism 8.0.1.

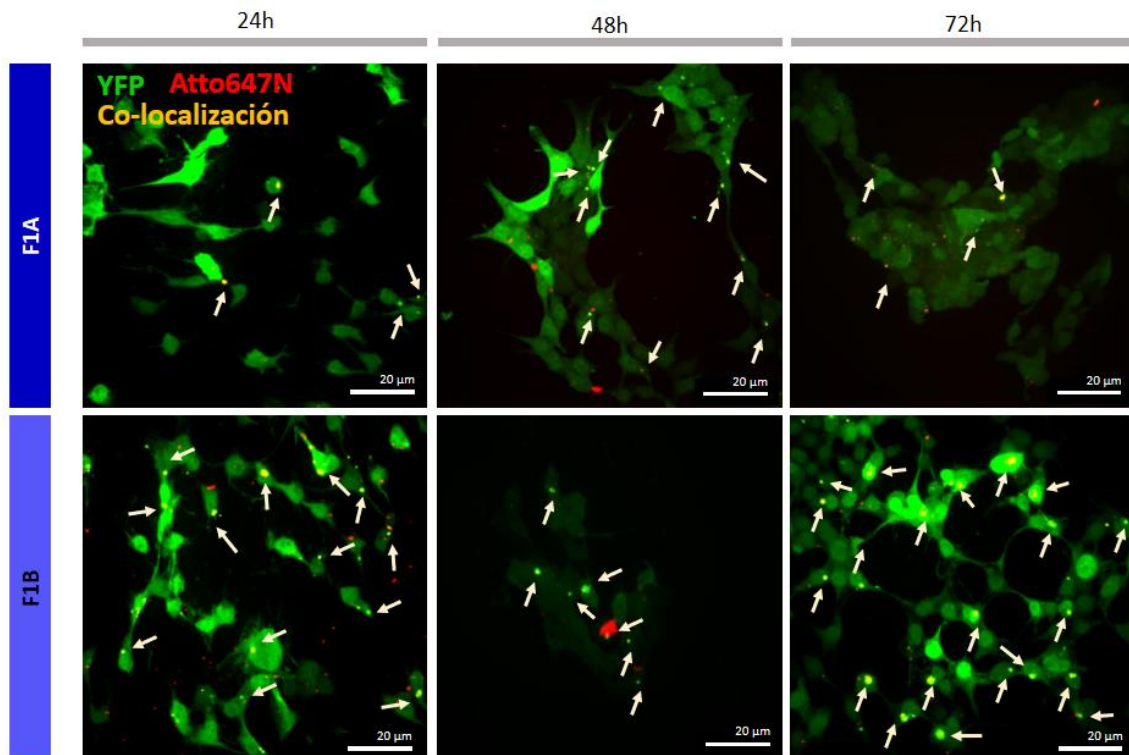
Siguiendo las recomendaciones de la norma UNE-EN ISO 10993-5:2009, se considera un efecto citotóxico significativo si la viabilidad celular disminuye en más de un 30 % en respuesta a un tratamiento, puede observarse que no existen diferencias de esa magnitud en cuanto a los efectos en la viabilidad celular causados por la expresión de la irisina, bajo ninguno de los agentes de transfección. Por este motivo, en un principio no se puede achacar a la expresión de esta proteína efectos tóxicos para las células, pese a observar el inicio de eventos de agregación a las 72h, de causa desconocida.

#### 4.3.5. Transfección de F1A y F1B en HEK293T-αS-YFP

En el *apartado 4.3.2*, se expone una primera prueba de concepto en la transfección de las células con las fibras preformadas, denominadas como F1A, F1B y F1C. Con el objetivo de poner a punto los experimentos de elongación *in cellulo*, se planificó un experimento en el que, en lugar de realizar una única observación a tiempo final, se estudió el proceso de elongación (**colocalización** de fibras y αS-YFP) en el tiempo: a 24, 48 y 72h. Para reducir la cantidad de muestras a analizar, se prescindió de

las F1C, ya que presentan una longitud significativamente menor a las otras dos (Apartado 4.3.1).

Las imágenes de la yuxtaposición de los canales verde y rojo (470nm,  $\alpha$ S; 640 nm, fibras, respectivamente), se muestran en la *figura 24*.

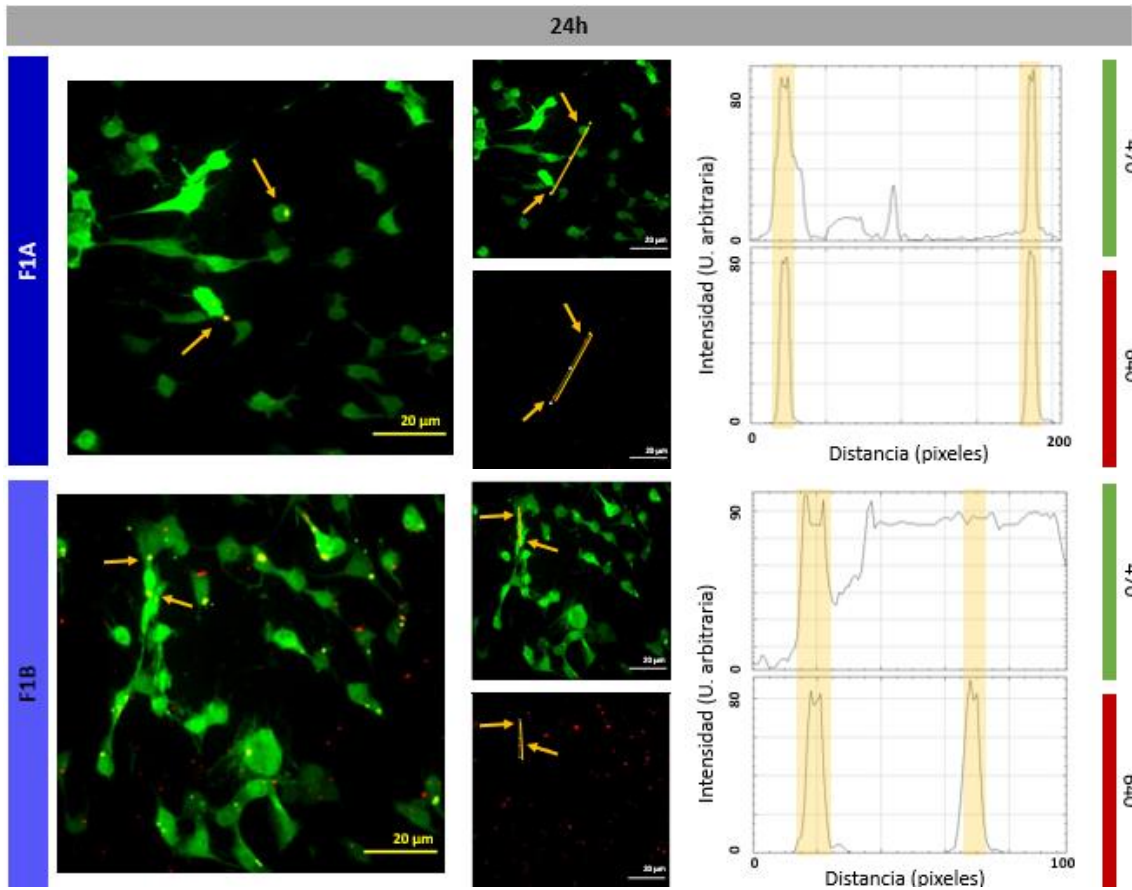


**Figura 24.** Resultado de la transfección de F1A y F1B mediante Jet OPTIMUS en HEK293T- $\alpha$ S-YFP. Imágenes de la yuxtaposición de los canales 470 y 640 nm. Barra de escala de 20  $\mu$ m, esquina inferior izquierda. Las flechas blancas señalan eventos de colocalización de  $\alpha$ S-YFP y fibras F1-Atto647N, **puncta** amarillo.

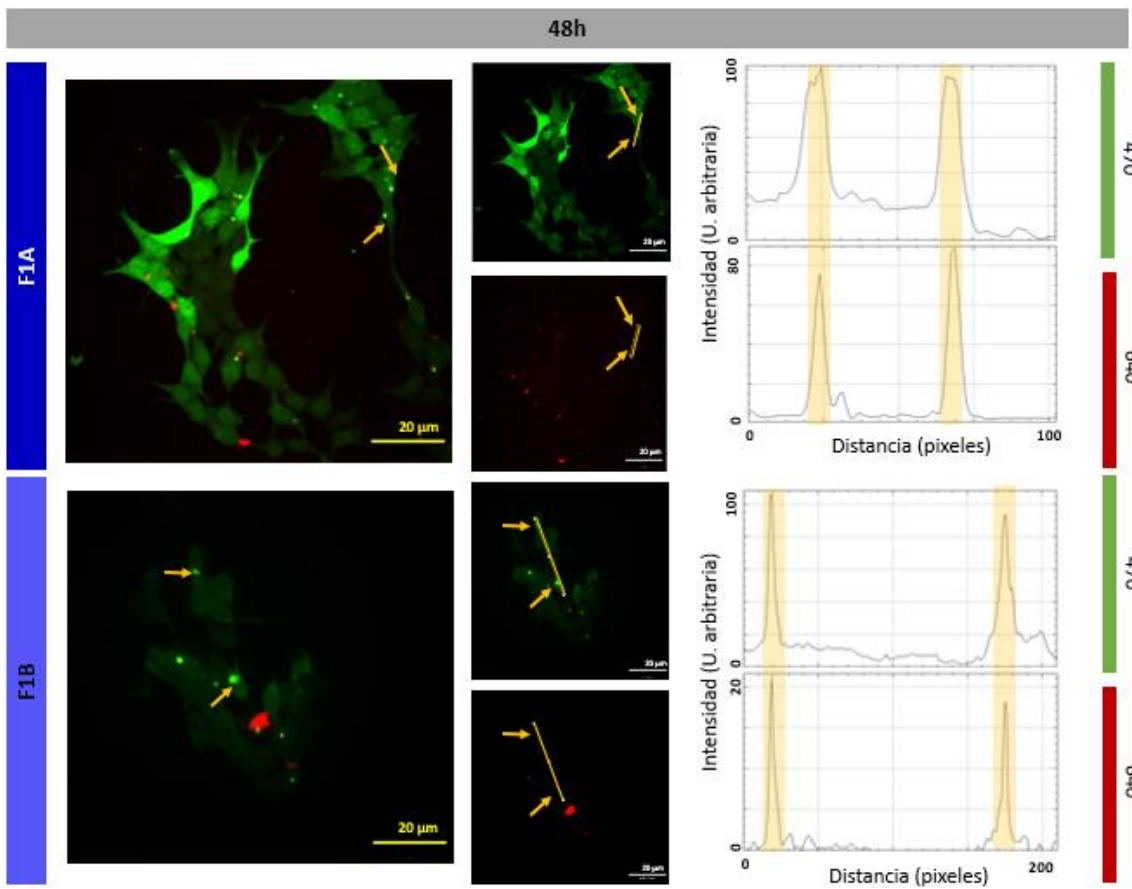
Al tratarse de procedimientos nuevos para el grupo de investigación, no se dispone actualmente de un método que permita cuantificar, de forma relativamente automática y eficaz la eficiencia de la transfección de las fibras, ni la magnitud de la colocalización causada por la elongación de las fibras en el interior de las HEK. Se realiza, por ello, un análisis de tipo **cualitativo**, apoyado en herramientas del Software de tratamiento de imagen por ImageJ; ver *figura 25*.



a.



b.



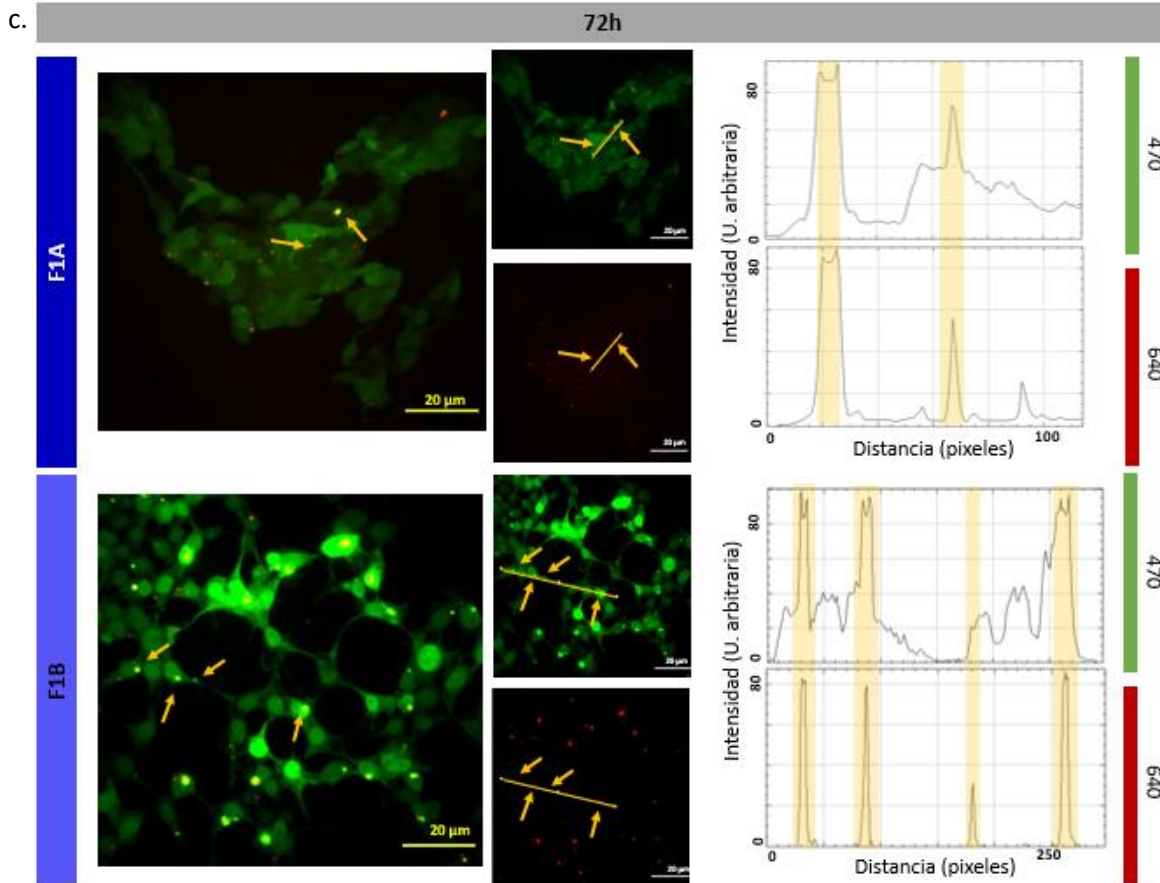


Figura 25. Representación del análisis de la colocalización de los puntos de fluorescencia, en el canal 470 y 640, indicativo de elongación de fibras de  $\alpha S$  in *cellulo*. Barra de escala de 20  $\mu m$ . Se utilizó la herramienta Plot Profile, del software de tratamiento de imagen Image J. En la figura se representan los resultados de las fibras 1A y 1B, tras el transcurso de (a) 24h, (b) 48h y (c) 72h. Flechas amarillas señalan en las imágenes los puntos de colocalización analizados, y una línea del mismo color indica el segmento estudiado. En la gráfica, que relaciona intensidad (en unidades arbitrarias) y distancia (en píxeles), aparecen señalados lo máximos de intensidad coincidentes.

Para el análisis, se utilizó la herramienta **Plot Profile** de Image J, que permite estudiar con mayor exactitud los eventos de colocalización que se observan como puntos amarillos en la yuxtaposición de los dos canales (puntos rojos y verdes, por separado). El resultado se puede observar como gráficas, que relacionan la distancia de la línea trazada (en píxeles, eje X), y la intensidad de fluorescencia recogida en el pixel por el que pasa la línea (eje Y), de manera que se puede observar la **coincidencia** de los **máximos de fluorescencia**, indicando que un punto rojo, asociado a una fibra de  $\alpha S$  preformada y marcada con la sonda Atto647N, colocaliza con un punto verde, indicativo de que varias moléculas de  $\alpha S$ -YFP se han adicionado a los extremos de la fibra (proceso de elongación).

Comparando las dos condiciones estudiadas, a todos los tiempos transcurridos, no se encuentran diferencias destacables entre las diferentes muestras de fibras (F1A o F1B), y se observa que tras el transcurso de 24h, ya es posible apreciar la aparición de

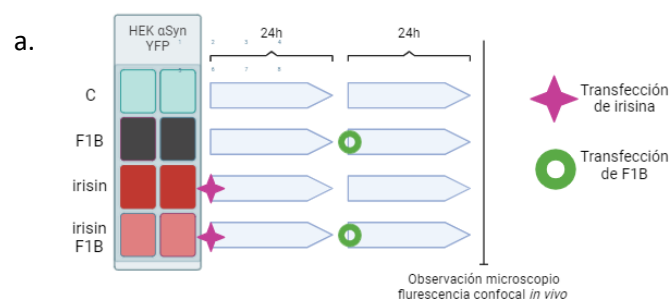
eventos de elongación en las células. Con el objetivo de reducir el número de muestras a tratar, se escogieron las fibras **F1B** para los experimentos finales del proyecto.

#### 4.3.6. Ensayo de la capacidad inhibitoria de la irisina sobre la elongación de fibras amiloides

Como parte final del proyecto, y tras haber analizado la expresión de la irisina y haber puesto a punto un modelo de elongación de fibras de  $\alpha$ S en las células HEK, se procedió a analizar la posible capacidad inhibitoria de la elongación de las fibras amiloides de  $\alpha$ S por parte de la irisina en el interior celular.

Para ello, se procede a la generación de 4 condiciones de cultivo paralelas, realizando 3 réplicas de cada una de ellas, para poder recabar datos suficientes para realizar cálculos estadísticos de los resultados. Estas condiciones consisten en un control, células transfectadas con irisina, células transfectadas con F1B y finalmente células en las que se transfectaron tanto con F1B como con el plásmido de la irisina. En todos los casos se utilizaron células HEK293T- $\alpha$ S-YFP y Jet OPTIMUS como agente de transfección (condiciones óptimas desarrolladas en este estudio).

Teniendo en cuenta la información obtenida de los experimentos anteriores, se diseñó el experimento de inhibición de la siguiente manera: se realizó una primera transfección del plásmido de **irisina**, que se dejó incubar durante **24 h** (tiempo suficiente para la expresión de la proteína, ver Figura 21), tiempo tras el que, si procede, se realiza una segunda transfección con **fibras F1B**, en este caso **sin marcar**, que se dejarán incubar otras **24 h** (tiempo suficiente para observar elongación, ver Figura 25). El motivo por el que se emplean fibras sin marcar es la limitación de láseres que permitan revelar las muestras, ya que tanto la sonda Atto647N como mCherry dan señal a la misma longitud de onda con el mismo láser. Se optó por eliminar el marcaje de las fibras y no de la irisina, ya que, como determinamos en los experimentos preliminares, es posible apreciar los eventos de elongación de las fibras introducidas mediante la identificación de punta en el canal de la  $\alpha$ S-YFP, ya que en todos los casos vimos que colocalizaban con las fibras marcadas. Es por ello que podemos cuantificar el proceso de elongación mediante la aparición de punta verde en las células HEK293T- $\alpha$ S-YFP. Por otro lado, identificaremos las células que expresan irisina (que se han transfectado con el plásmido) utilizando el canal rojo (mCherry). Se utilizó además tinción de los núcleos con Hoesch. Los resultados se recogen en la *figura 26*.



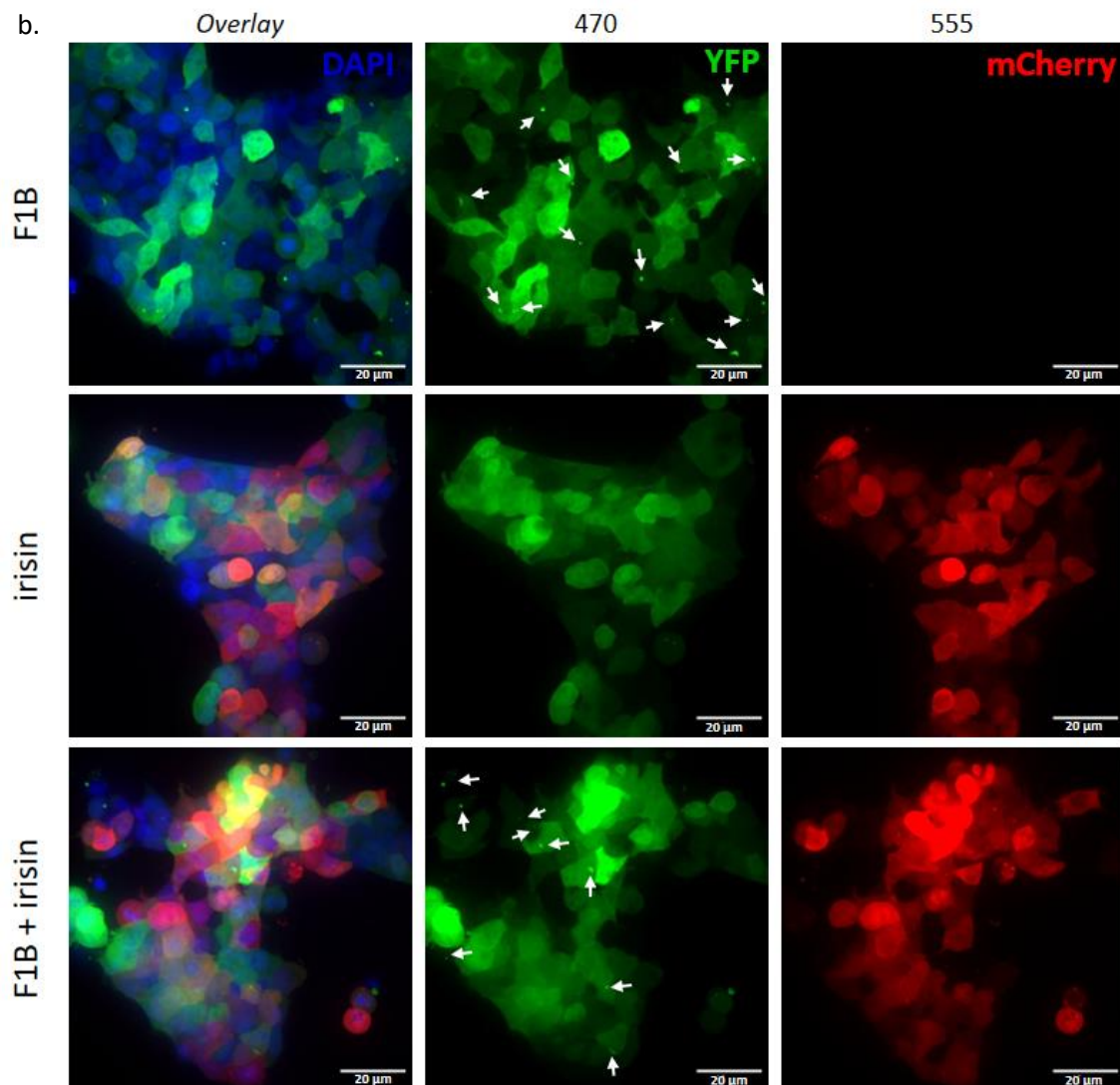


Figura 26. Resultados de la prueba de inhibición del proceso de elongación de fibras amiloides de  $\alpha$ S por parte de la irisin. (a) Esquema de la planificación del experimento. (b) Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia. Barra de escala de 20  $\mu$ m, esquina inferior izquierda.

Con el objetivo de poder generar resultados cuantitativos, se realizó un **contaje manual** de cada una de las réplicas de las condiciones, donde se determinó el número de células que presentan **agregados de  $\alpha$ S** (que indican procesos de elongación de las fibras introducidas), generando un porcentaje sobre las células, bien  $\alpha$ S+ (en la condición en la que solo se añaden fibras), o irisin+ (en la condición en la que solo se internaliza el plásmido de irisin), con el objetivo de observar si la expresión de irisin provoca una disminución de células en las que se aprecia un proceso de elongación de fibras amiloides. Los resultados de esta cuantificación se recogen en la *figura 27*.

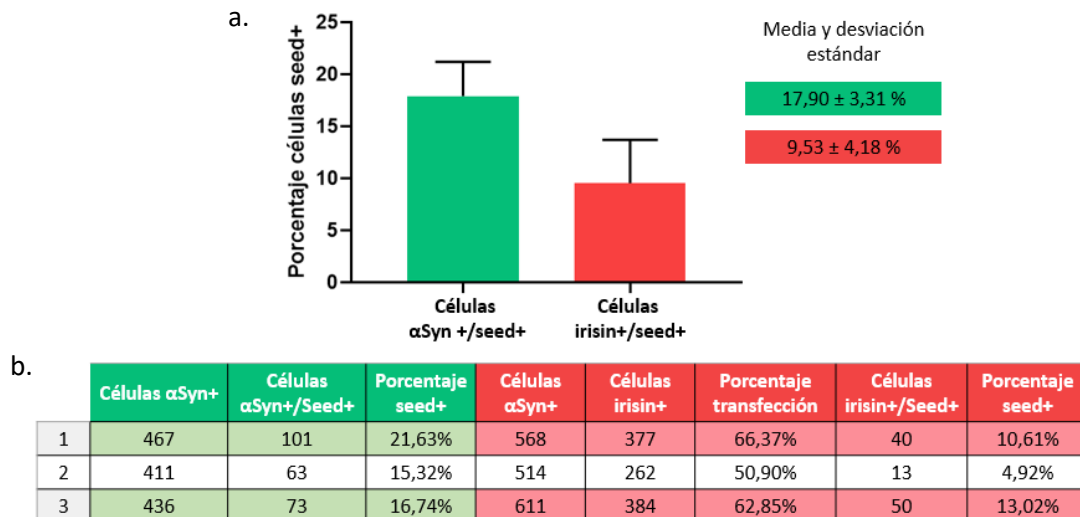


Figura 26. Comparativa del conteo de células capaces de realizar *seeding* ante la adición de fibras de primera generación en ausencia y presencia de irisina. (a) Gráfico que representa la media y desviación estándar de los valores, elaborado mediante GraphPad 8.0.1. (b) Tabla que recoge las medidas realizadas, cada fila representa una de las réplicas realizadas de los cultivos, nombradas como 1,2 y 3.

Con estos datos, se realizó un **test U** de **Mann-Whitney**, una prueba no paramétrica empleada para determinar si existen diferencias significativas entre dos grupos independientes. En este caso, estableciendo un  $P < 0,05$ , se determinó que los datos **no presentan una diferencia lo suficientemente significativa**. Pese a ello, resulta necesario indicar que se observa, en cierta medida, una **disminución** en el porcentaje de células en las que se aprecian eventos de elongación de fibras cuando estas expresan irisina respecto a las que no lo hacen, y, teniendo en cuenta que el tamaño de las muestras analizadas se encuentra alrededor de las 1500 células en ambos casos, no se considera que este resultado sea **concluyente**.

Para poder generar datos más robustos que permitan aceptar o desechar del todo la hipótesis de partida de que la irisina inhibe la elongación de fibras amiloides de  $\alpha$ Syn sería necesario primero optimizar el protocolo de preparación de fibras (condiciones de sonicación más drásticas), así como de internalización de fibras de manera que no sea necesaria la utilización de agentes de transfección que podrían afectar a la morfología de las fibras. De esta manera creemos que podremos aumentar el porcentaje de procesos de elongación en las células control HEK293T- $\alpha$ S-YFP. Así mismo, se está trabajando en el establecimiento de un método cuantitativo automático de colocalización en las imágenes obtenidas en varios canales que permita realizar medidas eficaces de la magnitud del proceso de elongación, para así poder generar datos concluyentes con una mayor nivel de muestreo.

## 5. Conclusiones / Conclusions

### 5.1. Conclusiones

De este proyecto, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Es viable **expresar** la proteína **irisina humana** mediante el diseño de plásmidos compatibles con su expresión en cepas de *E. coli*, aunque no ha sido posible obtener la proteína en la fracción **soluble** tras la lisis bacteriana en diferentes cepas de *E. coli* (BL21(DE3), C41(DE3) y Rosetta(DE3)pLysS) y su expresión es tóxica en las cepas probadas.
- Se ha llevado a cabo, en el laboratorio de la Dra. Cremades, la puesta a punto de un modelo celular eucariota de **elongación de fibras de  $\alpha$ -sinucleína** a través de la transfección de fibras pre-formadas en células que expresan la proteína  $\alpha$ -sinucleína fusionada a una proteína fluorescente (GFP/YFP) de manera constitutiva. La eficiencia de elongación de fibras en este modelo (en torno a 15-20%) puede ser mejorada. El modelo puede servir de base en el laboratorio para el estudio mecanístico del proceso de **elongación y propagación** de fibras amiloides de  $\alpha$ -sinucleína, así como de elongación cruzada entre proteínas ( $\alpha$ -sinucleína y tau por ejemplo), así como para el desarrollo de **inhibidores** con potencial terapéutico con actividad celular probada.
- La expresión de la proteína **irisina** en el modelo celular de elongación de fibras es **adecuada e inocua** para las células durante los primeros dos días tras la transfección, tiempo tras el cual la proteína comienza a formar agregados, de causa desconocida.
- **No** se obtuvieron resultados **concluyentes** sobre la posible capacidad de la **irisina** de **inhibir la elongación de las fibras** de  $\alpha$ -sinucleína. Exhiben una tendencia que apoyaría la hipótesis, aunque los datos no muestran significancia estadística suficiente. Un mayor muestreo, así como un análisis más detallado de los datos podrán proporcionar datos más concluyentes al respecto.

### 5.2. Conclusions

The following conclusions can be drawn from this project:

- It is feasible to **express human irisin** protein through the design of plasmids compatible with its expression in *E. coli* strains, although it has not been possible to obtain the protein in the **soluble** fraction after bacterial lysis in different *E. coli* strains (BL21(DE3), C41(DE3), and Rosetta(DE3)pLysS), and its expression is toxic in the tested strains.
- In Dr. Cremades' laboratory, a eukaryotic cell model of  **$\alpha$ -synuclein fiber elongation** has been established by transfecting pre-formed fibers into cells that constitutively express  $\alpha$ -synuclein fused to a fluorescent protein (GFP/YFP). The fiber elongation efficiency in this model (around 15-20%) can be improved. This model could serve as

a foundation in the laboratory for the mechanistic study of the **elongation and propagation** process of  $\alpha$ -synuclein amyloid fibers, as well as cross-seeding elongation between proteins (e.g.,  $\alpha$ -synuclein and tau), and for the development of **inhibitors** with therapeutic potential and proven cellular activity.

- The expression of **irisin** protein in the fiber elongation cell model is **adequate and harmless** to cells during the first two days post-transfection, after which the protein begins to form aggregates, the cause of which is unknown
- The results obtained regarding the possible ability of **irisin** to **inhibit the elongation of  $\alpha$ -synuclein fibers** are **inconclusive**. They show a trend that would support the hypothesis, although the data do not show statistical significance. A larger sample size, as well as a more detailed analysis of the data, may provide more conclusive results in this regard.

## 6. Bibliografía

1. Emamzadeh FN. Alpha-synuclein structure, functions, and interactions. *J Res Med Sci.* 2016;21:29.
2. Fitzpatrick AW, Debelouchina GT, Bayro MJ, Clare DK, Caporini MA, Bajaj VS, et al. Atomic structure and hierarchical assembly of a cross-beta amyloid fibril. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(14):5468-73.
3. Harrison RS, Sharpe PC, Singh Y, Fairlie DP. Amyloid peptides and proteins in review. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2007;159:1-77.
4. Aggarwal N, Eliaz D, Cohen H, Rosenhek-Goldian I, Cohen SR, Kozell A, et al. Protein nanofibril design via manipulation of hydrogen bonds. *Commun Chem.* 2021;4(1):62.
5. Cendrowska U, Silva PJ, Ait-Bouziad N, Muller M, Guven ZP, Vieweg S, et al. Unraveling the complexity of amyloid polymorphism using gold nanoparticles and cryo-EM. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(12):6866-74.
6. Bhasne K, Mukhopadhyay S. Formation of Heterotypic Amyloids: alpha-Synuclein in Co-Aggregation. *Proteomics.* 2018;18(21-22):e1800059.
7. Lashuel HA, Overk CR, Oueslati A, Masliah E. The many faces of alpha-synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. *Nat Rev Neurosci.* 2013;14(1):38-48.
8. Vamvaca K, Volles MJ, Lansbury PT, Jr. The first N-terminal amino acids of alpha-synuclein are essential for alpha-helical structure formation in vitro and membrane binding in yeast. *J Mol Biol.* 2009;389(2):413-24.
9. Kim TD, Choi E, Rhim H, Paik SR, Yang CH. Alpha-synuclein has structural and functional similarities to small heat shock proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;324(4):1352-9.
10. Bendor JT, Logan TP, Edwards RH. The function of alpha-synuclein. *Neuron.* 2013;79(6):1044-66.
11. Calabresi P, Mechelli A, Natale G, Volpicelli-Daley L, Di Lazzaro G, Ghiglieri V. Alpha-synuclein in Parkinson's disease and other synucleinopathies: from overt neurodegeneration back to early synaptic dysfunction. *Cell Death Dis.* 2023;14(3):176.
12. Li Y, Zhao C, Luo F, Liu Z, Gui X, Luo Z, et al. Amyloid fibril structure of alpha-synuclein determined by cryo-electron microscopy. *Cell Res.* 2018;28(9):897-903.
13. Eisenberg DS, Sawaya MR. Structural Studies of Amyloid Proteins at the Molecular Level. *Annu Rev Biochem.* 2017;86:69-95.
14. Guerrero-Ferreira R, Taylor NM, Mona D, Ringler P, Lauer ME, Riek R, et al. Cryo-EM structure of alpha-synuclein fibrils. *Elife.* 2018;7.
15. Spillantini MG, Goedert M. The alpha-synucleinopathies: Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, and multiple system atrophy. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;920:16-27.
16. Wakabayashi K, Tanji K, Odagiri S, Miki Y, Mori F, Takahashi H. The Lewy body in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol.* 2013;47(2):495-508.
17. Kanazawa T, Uchihara T, Takahashi A, Nakamura A, Orimo S, Mizusawa H. Three-layered structure shared between Lewy bodies and lewy neurites-three-dimensional reconstruction of triple-labeled sections. *Brain Pathol.* 2008;18(3):415-22.
18. Bloem BR, Okun MS, Klein C. Parkinson's disease. *Lancet.* 2021;397(10291):2284-303.
19. Ascherio A, Schwarzschild MA. The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *Lancet Neurol.* 2016;15(12):1257-72.
20. Lourenco MV, Frozza RL, de Freitas GB, Zhang H, Kincheski GC, Ribeiro FC, et al. Exercise-linked FNDC5/irisin rescues synaptic plasticity and memory defects in Alzheimer's models. *Nat Med.* 2019;25(1):165-75.
21. Schumacher MA, Chinnam N, Ohashi T, Shah RS, Erickson HP. The structure of irisin reveals a novel intersubunit beta-sheet fibronectin type III (FNIII) dimer: implications for receptor activation. *J Biol Chem.* 2013;288(47):33738-44.



22. Bostrom P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, et al. A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*. 2012;481(7382):463-8.
23. Islam MR, Valaris S, Young MF, Haley EB, Luo R, Bond SF, et al. Exercise hormone irisin is a critical regulator of cognitive function. *Nat Metab*. 2021;3(8):1058-70.
24. Jedrychowski MP, Wrann CD, Paulo JA, Gerber KK, Szpyt J, Robinson MM, et al. Detection and Quantitation of Circulating Human Irisin by Tandem Mass Spectrometry. *Cell Metab*. 2015;22(4):734-40.
25. Kam TI, Park H, Chou SC, Van Vranken JG, Mittenbuhler MJ, Kim H, et al. Amelioration of pathologic alpha-synuclein-induced Parkinson's disease by irisin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022;119(36):e2204835119.
26. Gracia P, Polanco D, Tarancon-Diez J, Serra I, Bracci M, Oroz J, et al. Molecular mechanism for the synchronized electrostatic coacervation and co-aggregation of alpha-synuclein and tau. *Nat Commun*. 2022;13(1):4586.
27. Yamasaki TR, Holmes BB, Furman JL, Dhavale DD, Su BW, Song ES, et al. Parkinson's disease and multiple system atrophy have distinct alpha-synuclein seed characteristics. *J Biol Chem*. 2019;294(3):1045-58.
28. Albrecht E, Norheim F, Thiede B, Holen T, Ohashi T, Schering L, et al. Irisin - a myth rather than an exercise-inducible myokine. *Sci Rep*. 2015;5:8889.
29. Dumon-Seignovert L, Cariot G, Vuillard L. The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). *Protein Expr Purif*. 2004;37(1):203-6.
30. Froula JM, Castellana-Cruz M, Anabtawi NM, Camino JD, Chen SW, Thrasher DR, et al. Defining alpha-synuclein species responsible for Parkinson's disease phenotypes in mice. *J Biol Chem*. 2019;294(27):10392-406.
31. Arima, K., Hirai, S., Sunohara, N., Aoto, K., Izumiyama, Y., Uéda, K., Ikeda, K., & Kawai, M. Cellular co-localization of phosphorylated tau- and NACP/alpha-synuclein-epitopes in lewy bodies in sporadic Parkinson's disease and in dementia with Lewy bodies. *Brain research*. 1999;843(1-2): 53–61.
32. Ishizawa, T., Mattila, P., Davies, P., Wang, D., & Dickson, D. W. Colocalization of tau and alpha-synuclein epitopes in Lewy bodies. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2003;62(4): 389–397.
33. Chatani, E., Lee, Y. H., Yagi, H., Yoshimura, Y., Naiki, H., & Goto, Y. Ultrasonication-dependent production and breakdown lead to minimum-sized amyloid fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(27): 11119–11124.

# Anexos

## 1. Plásmidos, genes sintéticos y cebadores

### 1.1. Plásmidos de expresión procariota

#### 1.1.1. Mapa del plásmido pET15b-His-3C-irisin

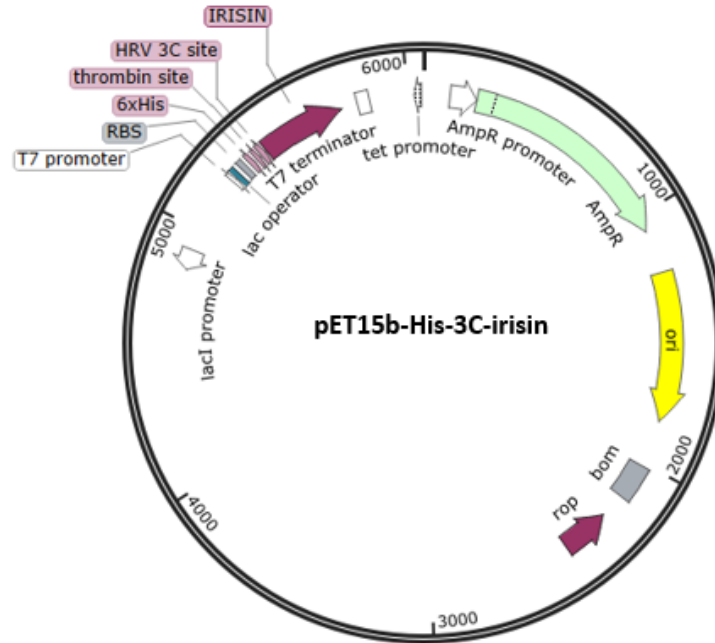


Figura A1. Mapa del plásmido Pet15b-His-3C-irisin. Imagen extraída de Addgene, código del plásmido 122612

#### 1.1.2. Mapa del plásmido pET15b-His-irisin y pET15b-His-irisin-M1D

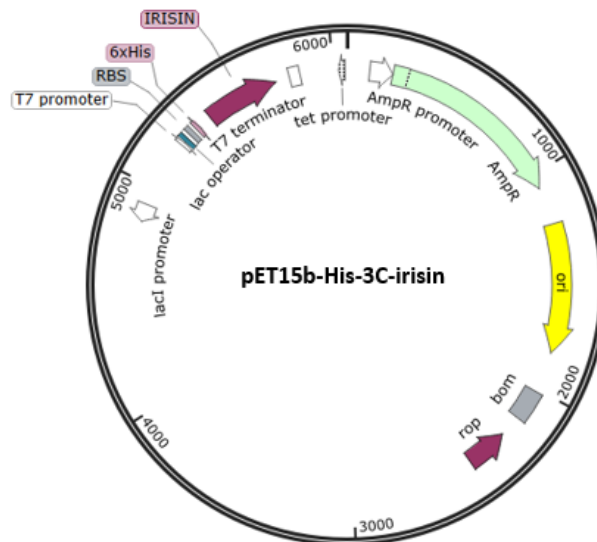


Figura A2. Mapa del plásmido Pet15b-His-irisin. Imagen extraída de Addgene, código del plásmido 122612

### 1.1.3. Constructo del gen sintético de pET15b-His-3C-irisin



TTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAACC**ATG**GGCAGCAGC**CATCATCATCATCATCAC**AGCAG  
CGGC**CTGGTGCCGCGCGGCAGC**CATATG**CTTGAAGTCCTCTTT**CAGGGACCC**CATATGTCGCCG**  
**TCAGCTCCGGTCAATGTTACCGTCCGTACCTGAAAGCAAATAGTGCCGTTGTCTCGTGGGATG**  
**TCCTGGAAGATGAAGTCGTTATTGGCTTTGCAATCAGCCAGCAGAAAAAAGATGTCCGTATGCT**  
**GCGCTTCATTCAGGAAGTGAACACCACGACCCGTAGTTGCGCGCTGTGGGATCTGGAAGAAGAC**  
**ACGGAATATATCGTGCATGTTCAAGCGATTTCCATCCAGGGTCAAAGCCCGCCTCTGAACCGG**  
**TCCTGTTTAAAACCCCGCGTGAAGCAGAAAAGATGGCAAGCAAGAACAAGGACGAAGTGACGAT**  
**GAAGGAA**TAA****

### 1.1.4. Constructo del gen sintético de pET15b-His-irisin



TTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAACC**ATG**GGCAGCAGC**CATCATCATCATCATCAC**AGCAG  
CGGC**ATGTCGCCGTCAGCTCCGGTCAATGTTACCGTCCGTACCTGAAAGCAAATAGTGCCGTT**  
**GTCTCGTGGGATGTCTGGAAGATGAAGTCGTTATTGGCTTTGCAATCAGCCAGCAGAAAAAAG**  
**ATGTCCGTATGCTGCGCTTCATTCAGGAAGTGAACACCACGACCCGTAGTTGCGCGCTGTGGGA**  
**TCTGGAAGAAGACACGGAATATATCGTGCATGTTCAAGCGATTTCCATCCAGGGTCAAAGCCCG**  
**GCCTCTGAACCGTCTGTGTTAAAACCCCGCGTGAAGCAGAAAAGATGGCAAGCAAGAACAAGG**  
**ACGAAGTGACGATGAAGGAA**TAA****

### 1.1.5. Constructo del gen sintético de pET15b-His-irisin-M1D



TTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAACC**ATG**GGCAGCAGC**CATCATCATCATCATCAC**AGCAG  
CGGC**GAC**TCGCCGTCAGCTCCGGTCAATGTTACCGTCCGTACCTGAAAGCAAATAGTGCCGTT  
**GTCTCGTGGGATGTCTGGAAGATGAAGTCGTTATTGGCTTTGCAATCAGCCAGCAGAAAAAAG**  
**ATGTCCGTATGCTGCGCTTCATTCAGGAAGTGAACACCACGACCCGTAGTTGCGCGCTGTGGGA**  
**TCTGGAAGAAGACACGGAATATATCGTGCATGTTCAAGCGATTTCCATCCAGGGTCAAAGCCCG**  
**GCCTCTGAACCGTCTGTGTTAAAACCCCGCGTGAAGCAGAAAAGATGGCAAGCAAGAACAAGG**  
**ACGAAGTGACGATGAAGGAA**TAA****

## 1.2. Plásmidos de expresión eucariota

### 1.2.1. Mapa del plásmido pJac346\_irisin\_mCherry

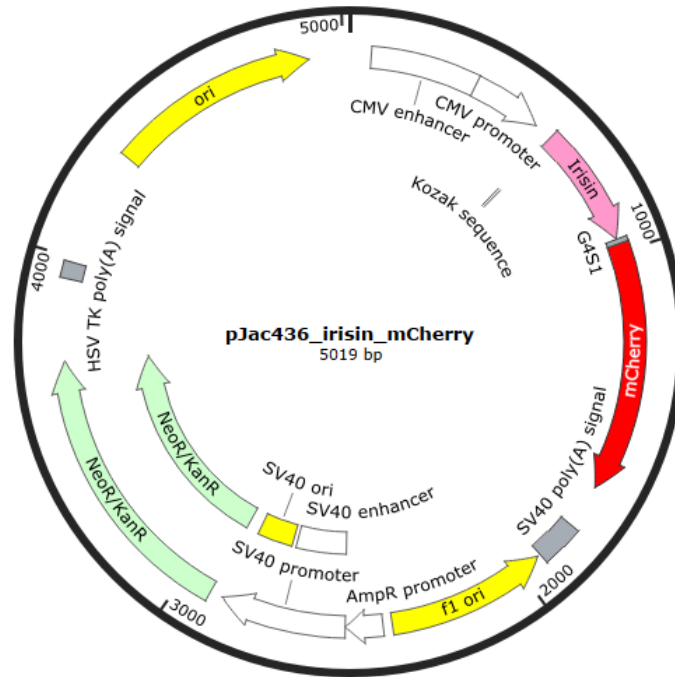


Figura A3. Mapa del plásmido pJac346-irisin-mCherry. Imagen extraída de Addgene, código del plásmido pEGFP\_N1

### 1.2.2. Mapa del plásmido pJac346\_irisin

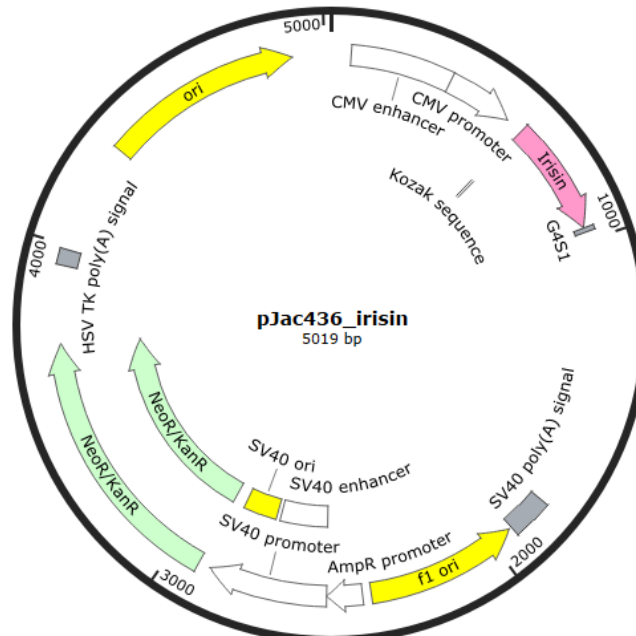


Figura A4. Mapa del plásmido pJac346-irisin. Imagen extraída de Addgene, código del plásmido pEGFP\_N1

### 1.3. Cebadores empleados para la generación de los plásmidos de expresión procariota

Cebador	Secuencia	Longitud
Del_3C_Fw	5' CATCATCACAGCAGCGGCATGTCGCCGTCAGCTCCGGTC 3'	39 pb
Del_3C_Rv	5' GCCGCTGCTGTGATGATGATGATG 3'	24 pb
Del_3C_M1D_Fw	5' CATCATCACAGCAGCGGCGACTCGGCCGTCAGCTCCGGTCAAT 3'	42 pb
Del_3C_M1D_Rv	5' GTCGCCGCTGCTGTGATGATGATGAT 3'	26 pb

Tabla A1. Cebadores empleados para la generación de los plásmidos de expresión procariota. Los dos primeros corresponden con la elaboración del plásmido pET15b-His-irisin, que presenta la delección de los sitios de corte de las proteasas 3C y trombina; y el segundo par a pET15b-His-irisin\_M1D, que presenta la mencionada delección y una mutación que sustituye Metionina por Aspártico en la primera posición (M1D). Fw hace referencia al cebador directo (Forward) y Rv al reverso (Reverse)

### 1.4. Cebadores empleados para la generación de los plásmidos de expresión eucariota

Cebador	Secuencia	Longitud
pJac346_Irisin_mCherry_Fw	5' GTTCATGCGCTTCAAGGTGCAC 3'	22 pb
pJac346_Irisin_mCherry_Rv	5' CTTATATAGACCTCCCACCGTACAC 3'	25 pb
pJac346_Irisin_Fw	5' GATGAGGTGACCATGAAGGAGTAAAGCGGCCGCGACTC 3'	38 pb
pJac346_Irisin_Rv	5' CCTTCATGGTCACCTCATCTTTG 3'	23 pb

Tabla A2. Cebadores empleados para la generación de los plásmidos de expresión eucariota. Los dos primeros corresponden con la elaboración del pJac346\_Irisin\_mCherry, en azul, y el segundo par a pJac346\_Irisin, de manera que se ha eliminado el fragmento génico de expresión de la proteína mCherry, en verde. Fw hace referencia al cebador directo (Forward) y Rv al reverso (Reverse)

## 2. Composición MasterMix y programa de la PCR

	1 reacción (23 µL totales)
Buffer HF (5x)	5 µL
dNTPs (2,5 mM)	2,5 µL
Phusion® HF Polymerase	0,25 µL
Betaine (5M)	5 µL
DMSO 2,5%	0,625 µL
deionized H2O	9,625 µL

Tabla A3. Composición del MasterMix empleado para la PCR. A esta solución se deben añadir 1 µL del DNA plasmídico a una concentración de 1 ng/µL, y 1 µL de una solución de los cebadores directo y reverso, a una concentración de 5 Mm

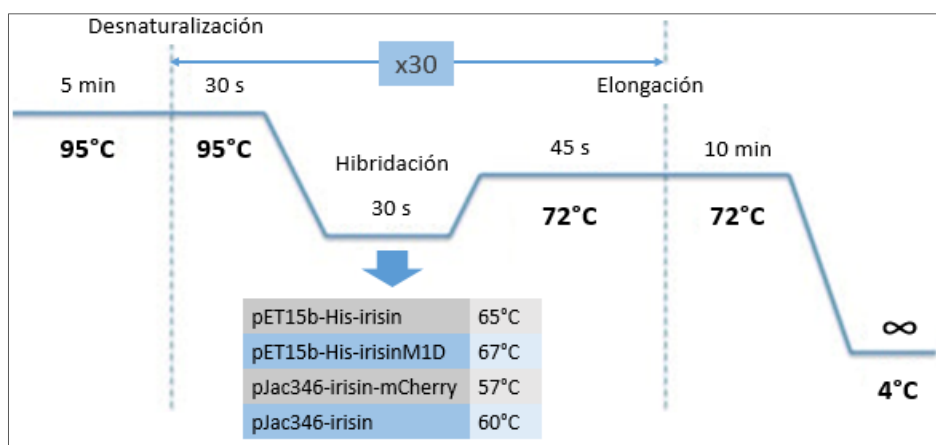


Figura A5. Programa de PCR empleado. Las temperaturas en color negro son comunes para todos los constructos, mientras que las diferentes temperaturas de hibridación necesarias para cada pareja de cebadores, se recoge en una pequeña tabla.

### 3. Composición de los geles de SDS-PAGE

Reactivo	Gel concentrador al 4%	Gel separador al 15%
H <sub>2</sub> O destilada	3,8 mL	3,59 mL
Acrilamida al 40%	500 µL	3,75 mL
Tris-HCl 1 M pH 6,8	625 µL	-
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	-	2,5 mL
SDS 20%	25 µL	50 µL
APS 10%	50 µL	100 µL
TEMED	5 µL	10 µL

Tabla A4. Composición de los geles de acrilamida empleados para la electroforesis SDS-PAGE. Estos volúmenes permiten la elaboración de dos geles, al porcentaje indicado de acrilamida. El gel separador se encuentra en la parte inferior del gel, y el concentrador en la superior, donde se encuentran los pocillos.

### 4. Tablas de equivalencia de los volúmenes de urea en los que se resuspenden los diferentes pellets celulares

a.

<i>E. coli</i> BL21		Control			IPTG		
		Peso <i>pellet</i>	Volumen urea añadido al precipitado	Volumen urea añadido al sobrenadante	Peso <i>pellet</i>	Volumen urea añadido al precipitado	Volumen urea añadido al sobrenadante
37°C 2h	wt	0,39 g	1,14 mL	0,94 mL	0,17 g	0,5 mL	0,3 mL
	del_D	0,20 g	0,6 mL	0,52 mL	0,20 g	0,6 mL	0,4 mL
30°C 4h	wt	0,27 g	0,8 mL	0,6 mL	0,22 g	0,65 mL	0,45 mL
	del_D	0,31 g	0,9 mL	0,7 mL	0,38 g	1 mL	0,8 mL
18°C O/N	wt	0,22 g	0,65 mL	0,45 mL	0,17 g	0,5 mL	0,3 mL
	del_D	0,23 g	0,7 mL	0,5 mL	0,24 g	0,7 mL	0,5 mL

b.

<i>E. coli</i> C411		Control			IPTG		
		Peso <i>pellet</i>	Volumen urea añadido al precipitado	Volumen urea añadido al sobrenadante	Peso <i>pellet</i>	Volumen urea añadido al precipitado	Volumen urea añadido al sobrenadante
37°C 2h	wt	0,21 g	0,62 mL	0,42 mL	0,21 g	0,62 mL	0,42 mL
	del_D	0,17 g	0,5 mL	0,3 mL	0,14 g	0,41 mL	0,21 mL
30°C 4h	wt	0,22 g	0,65 mL	0,45 mL	0,26 g	0,76 mL	0,56 mL
	del_D	0,31 g	0,91 mL	0,71 mL	0,19 g	0,55 mL	0,35 mL
18°C O/N	wt	0,11 g	0,32 mL	0,12 mL	0,29 g	0,55 mL	0,35 mL
	del_D	0,19 g	0,55 mL	0,35 mL	0,23 g	0,65 mL	0,45 mL

c.

<i>E. coli</i> Rosetta pLyss		Control			IPTG		
		Peso <i>pellet</i>	Volumen urea	Volumen urea añadido	Peso <i>pellet</i>	Volumen urea	Volumen urea añadido

			añadido al precipitado	al sobrenadante		añadido al precipitado	al sobrenadante
37°C	wt	0,10 g	0,29 mL	0,19 mL	0,11 g	0,32 mL	0,12 mL
2h	del_D	0,29 g	0,85 mL	0,65 mL	0,13 g	0,38 mL	0,18 mL
30°C	wt	0,16 g	0,47 mL	0,27 mL	0,19 g	0,55 mL	0,35 mL
4h	del_D	0,17 g	0,5 mL	0,3 mL	0,10 g	0,29 mL	0,19 mL
18°C	wt	0,28 g	0,82 mL	0,62 mL	0,17 g	0,5 mL	0,3 mL
O/N	del_D	0,24 g	0,7 mL	0,5 mL	0,22 g	0,64 mL	0,44 mL

Tabla A5. Volúmenes de urea empleados para la disolución de las muestras obtenidas en la prueba de solubilización de la irisina. a, *E. coli* BL21; b, *E. coli* C41; c, *E. coli* Rosetta pLyss