



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 307 018**

51 Int. Cl.:

C12N 15/81 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

C07K 14/395 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04737685 .0**

86 Fecha de presentación : **09.07.2004**

87 Número de publicación de la solicitud: **1644505**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **12.04.2006**

54

Título: **Modelo de levadura para la toxicidad de proteínas amiloidogénicas.**

30

Prioridad: **11.07.2003 EP 03447184**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2008

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2008

73

Titular/es: **reMynd N.V.**
Minderbroederstraat 12
3000 Leuven, BE

72

Inventor/es: **Griffioen, Gerard;**
Duhamel, Hein;
Van Damme, Nele;
Winderickx, Joris y
Wera, Stefaan

74

Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 307 018 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Modelo de levadura para la toxicidad de proteínas amiloidogénicas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un modelo de levadura y al uso del mismo para el cribado ("screening") farmacéutico, para el modelado de enfermedades neurodegenerativas y para el modelado celular de la bioquímica de las proteínas amiloidogénicas implicadas en las mismas.

10 **Antecedentes de la invención**

Los trastornos neurodegenerativos esporádicos relacionados con la edad se caracterizan por una incidencia elevada anormal de la pérdida de células neuronales que, dependiendo de la localización en el cerebro afectado, conduce a una pérdida de memoria y/o disfunción motriz y cognitiva. La agregación aberrante de proteínas específicas (intracelulares o extracelulares) es una característica patológica común de dichas enfermedades. Por ejemplo, los cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer contienen placas extraneuronales compuestas de beta-amiloide y agregados intracelulares compuestos de otra proteína, denominada tau. Asimismo, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad con cuerpos de Lewy se caracterizan por precipitados intracelulares e inclusiones de alfa-sinucleína (Taylor *et al.* (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99, 13972-4).

El mecanismo molecular subyacente responsable del desarrollo de estas fibrilas proteináceas es ampliamente desconocida, pero en muchos casos parecer ser que iones metálicos (entre otros desencadenantes y factores de riesgo) juegan un papel importante.

Una hipótesis actual supone que los agregados de proteínas o el propio proceso de agregación es neurotóxico. Por ejemplo, las inclusiones de alfa-sinucleínas o beta-amiloides parecen provocar disfunción neuronal y estrés oxidativo. Otros estudios indicaron que los oligómeros solubles de proteínas amiloidogénicas que se forman durante las primeras etapas del proceso de agregación parecen ser citotóxicas en lugar de las propias inclusiones insolubles. Esto dio lugar a la sugerencia de que la citotoxicidad ejercida por varias proteínas amiloidogénicas se refiere a un mecanismo común. La agregación de proteínas se considera como un complejo de múltiples etapas iniciadas presumiblemente por el despliegue parcial de proteínas formadoras de amiloides que, a continuación, conduce además a la formación de oligómeros y en último caso de grandes agregados. Los factores de riesgo (tales como iones metálicos, envejecimiento, mutaciones en los genes respectivos...) pueden provocar el despliegue y consecuentemente la formación de fibrilas de proteínas amiloidogénicas.

La acumulación de proteínas desplegadas en la célula provoca una respuesta dirigida a eliminar estas proteínas. De hecho, las proteínas en la enfermedad de Alzheimer (placas amiloides), enfermedad de Parkinson y enfermedad con cuerpos de Lewy están ubiquitinadas, presumiblemente como parte de un mecanismo de defensa celular para aclarar estas proteínas desnaturalizadas a través de la degradación mediada por proteosomas. Sin embargo, las inclusiones de proteínas son resistentes a la degradación de proteínas proteosómicas quizás porque los propios agregados inhiben la maquinaria proteosómica (Miller *et al.* (2003), Trends Pharmacol Sci 24, 18-23; Syner *et al.* (2003), J Biol Chem 278, 11753-9). De manera interesante en este contexto, muchos productos génicos asociados con la neurodegeneración también son un sustrato para caspazas, un grupo de proteasas implicadas en la ejecución de la apoptosis (Bredesen (1999) Neural notes (Promega) IV, 3-6)). En la actualidad, la relevancia fisiológica del procesado mediado por caspazas sigue sin conocerse.

La enfermedad de Parkinson se caracteriza por la pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra*, conduciendo a déficits dopaminérgicos y problemas motrices (Steece-Collier *et al.*, (2002), Proc Natl Acad Sci USA 99: 13972-13974). Las inclusiones de alfa-sinucleína en neuronas de *substantia nigra* son una característica patológica principal y juegan un papel esencial en la etiología de la enfermedad. Varios estudios han demostrado que el estrés oxidativo provoca la formación de agregados tóxicos de alfa-sinucleína. El hierro, un metal activo redox, también provoca la formación de agregados a través de la formación de complejos con fibrilas de alfa-sinucleína (Bus (2000), Curr Opin Chem Biol. 4, 184-191, Ostrera-Golts, citada anteriormente). En las células de la *substantia nigra* se combinan ambos factores de riesgo, ya que estas neuronas están enriquecidas en hierro y contienen niveles relativamente elevados de agentes formadores de radicales debido al metabolismo de dopamina. Esta combinación de factores de riesgo podría explicar la degeneración selectiva de células de *substantia nigra* observadas en la enfermedad de Parkinson (Steece-Collier, citada anteriormente).

El mecanismo molecular de la citotoxicidad de las fibrilas de alfa-sinucleína sigue sin conocerse, la alfa-sinucleína podría interferir con la actividad proteosómica o inhibirla y, de este modo, afectar a la integridad de la célula. Alternativamente, los propios agregados pueden generar estrés oxidativo, un proceso en el que el hierro complejo podría jugar un papel fundamental (Turnbull *et al.*, citado anteriormente). La observación reciente de que la MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) que inducía la pérdida de neuronas dopaminérgicas en ratones naturales (MPTP provoca un estrés oxidativo intracelular agudo) se suprime bruscamente en ratones sin alfa-sinucleína demuestra el papel clave de alfa-sinucleína en la etiología de la enfermedad de Parkinson (Dauer *et al.* (2002), Proc Natl Acad Sci USA 99, 14524-14529).

Se han desarrollado diferentes tipos de modelos de animales para el estudio de enfermedades neurodegenerativas, en base a estrategias transgénicas o de inducción por toxinas. Se ha desarrollado un modelo animal para la enfermedad de Parkinson en ratones y ratas mediante la inyección de vectores virales que codifican mutantes naturales o clínicos de alfa-sinucleína en la *substantia nigra* de estos animales (Kirik *et al.* (2003) PNAS 100, 2882-2889). La sobreexpresión resultante de alfa-sinucleína da lugar a cambios neurológicos dependientes del tiempo que recuerdan a la patología de Lewy y se pueden utilizar para el cribado de potenciales productos terapéuticos. Aunque estos modelos en la mayoría de los casos son capaces de replicar la mayoría de características clínicas y patológicas de la enfermedad, el tiempo inherente y las limitaciones de infraestructura los hace menos adecuados para el cribado de alto rendimiento. El gen que codifica la alfa-sinucleína se ha transferido al genoma de la *Drosophila melanogaster*, a través del cual las moscas transgénicas también recapitulan las características esenciales de la enfermedad del Parkinson y se ha sugerido como un ensayo de cribado para fármacos (Pendleton *et al.* (2002) J Pharm Exp Therapeut 300, 91-96).

Se ha demostrado que las levaduras son un buen vehículo para la expresión de proteínas humanas basándose en la gran similitud entre las células de levadura y células humanas a nivel molecular. De esta manera se ha obtenido mucha información sobre la interacción de proteínas y ADN en mecanismos celulares implicados en procesos normales y/o enfermedades humanas. Las alfa-sinucleínas natural y mutante se han expresado en levadura con el objetivo de analizar la regulación del mal plegamiento (<http://www.mcmp.purdue.edu/faculty/rochet.php>). La expresión de dominios diferentes de alfa-sinucleína natural en *E. coli* condujo a la identificación de un truncamiento C-terminal sensible a proteasa. El uso del método "two-hybrid screen" en levadura ha posibilitado la identificación de sinfilina-1 como compañera en la interacción con proteínas de la alfa-sinucleína (Neystat *et al.* (2002) Neurosci Lett 325, 119-123).

El documento WO02/065136 describe el uso de levadura como modelo para cribar compuestos o dianas de fármacos con valor terapéutico para enfermedades asociadas con la agregación de proteínas. Esto implica la expresión de péptidos amiloidogénicos en levadura que están en contacto con un agente que induce toxicidad en la célula de levadura. Ejemplos de dichos agentes inductores de toxicidad son fuentes de carbono, iones metálicos, etc...

Descripción resumida de la invención

La presente solicitud describe un modelo de levadura que recapitula los efectos citotóxicos de proteínas amiloidogénicas. Este modelo consiste en células de levadura en las que una proteína amiloidogénica se expresa de manera heteróloga y donde la formación de fibrilas y/o agregación de dicha proteína da lugar a una lectura del fenotipo, incluyendo, pero sin limitarse a la supervivencia celular, proliferación, actividad del gel informador o actividad enzimática de una proteína informadora.

La presente invención proporciona un modelo de levadura para enfermedades neurodegenerativas en las que los efectos tóxicos de las proteínas amiloidogénicas son más pronunciados, que es ventajoso tanto para el análisis del mecanismo de las enfermedades neurodegenerativas como el cribado de potenciales (precursores) agentes terapéuticos o dianas de fármacos para su uso en el tratamiento de neuropatía amiloidogénicas. Más particularmente, la presente invención proporciona una célula de levadura manipulada que tiene las características tal como se describen en las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención se basa en la observación de que la expresión de proteínas amiloidogénicas en levadura natural da lugar a la formación de fibrilas de amiloides y/o la agregación de estas proteínas proporcionando una lectura del fenotipo. Más particularmente, se observó que la expresión de dichas proteínas en levadura natural puede ser tóxica. Un efecto negativo dominante de las proteínas amiloidogénicas se pone de manifiesto a partir de la observación de que la proliferación de células de levadura que expresan el gen que codifica estas proteínas o derivados mutantes de las mismas se reduce en relación a las cepas de control, especialmente cuando iones metálicos, tales como iones zinc (Zn²⁺) o iones hierro (Fe³⁺) complementan al medio de crecimiento.

Esta toxicidad dependiente de iones metálicos de las proteínas amiloidogénicas en levaduras se parece a la degeneración observada en los cerebros de pacientes de enfermedades neurodegenerativas. Más particularmente, la toxicidad dependiente de iones metálicos de alfa-sinucleína mimetiza la degeneración observada en las células de la *substantia nigra* en los cerebros con enfermedad de Parkinson, ya que la formación estimulada por hierro de fibrilas de alfa-sinucleína dañinas parece ser la principal responsable de la pérdida de neuronas dopaminérgicas. De este modo, la presente invención se refiere al uso de una célula de levadura manipulada tal como se caracteriza en la reivindicación 1, como modelo de levadura para amiloidosis, tales como la enfermedad de Parkinson y la enfermedad con cuerpos de Lewy, en el que la expresión tóxica de proteínas amiloidogénicas mimetiza los efectos neurotóxicos en el cerebro enfermo.

Esta solicitud describe además la expresión de genes o minigenes que codifican proteínas amiloidogénicas en una cepa que carece de un gen funcional sensible al estrés oxidativo. Más particularmente, una cepa de levadura que como resultado de una mutación por eliminación carece de un gen de caspasa funcional de la levadura (*yca1*), se observó que mostraba una mayor sensibilidad a la expresión de proteínas amiloidogénicas. La expresión de dichas proteínas en una cepa mutante tal como *yca1*, conduce a una inhibición del crecimiento más intensa en comparación con las cepas de levaduras naturales expresan un gen de caspasa funcional. Más particularmente, se observó que, incluso en ausencia de iones metálicos en el medio de crecimiento, se reducía fuertemente la proliferación de una cepa *yca1* que expresa proteínas amiloidogénicas humanas naturales, tales como alfa-sinucleína humana natural. Eso demuestra que los genes de levadura sensibles al estrés oxidativo, tales como el gen que codifica la caspasa, juegan un papel en el mecanismo molecular que hace que las proteínas amiloidogénicas sean tóxicas en células de levadura.

De este modo, según un aspecto de la invención, las cepas de levadura que carecen de un gen funcional sensible al estrés oxidativo que es un gen YCa1 de caspasa, expresa una o más proteínas amiloidogénicas o derivados mutantes de las mismas, se utilizan como modelo para la citotoxicidad de estas proteínas amiloidogénicas en mamíferos. Más particularmente, se proporcionan cepas de levadura que carecen de un gen funcional de caspasa Yca1, tales como las cepas mutantes *yca1*, las cuales son particularmente sensibles a la expresión de proteínas amiloidogénicas.

El carácter citotóxico más pronunciado de las proteínas amiloidogénicas, tales como alfa-sinucleína en células de levadura *yca1* en comparación con células naturales facilita ampliamente cribados de alto rendimiento dirigidos a identificar compuestos químicos o ADNc humanos que invierten o eliminan presuntos efectos citotóxicos de estas proteínas. En primer lugar, la citotoxicidad se puede detectar con niveles relativamente bajos de reactivos estimuladores de fibrilas (tales como de iones metálicos) o posiblemente incluso sin estos agentes. Esto da lugar a una menor frecuencia de falsos positivos en cribados de alto rendimiento, ya que no se identifican “aciertos” que neutralizan los efectos de los activos estimuladores de fibrilas, pero no eliminan la toxicidad de proteínas amiloidogénicas como tales. En segundo lugar, la mayor citotoxicidad de alfa-sinucleína da lugar a una mayor diferencia en el crecimiento entre cepas productoras de alfa-sinucleína y cepas de control (es decir, la lectura del crecimiento es más sensible). El resultado de esto es un ensayo más astringente para la identificación de compuestos (incluyendo ADNcs) que modulan los efectos tóxicos de proteínas amiloidogénicas, reduciendo el número de falsos positivos. Por otro lado, como el ensayo es más sensible, los compuestos que tienen un efecto modulador más limitado sobre la toxicidad de las proteínas amiloidogénicas, tienen más posibilidades de ser identificados, dando lugar a menos falsos negativos o más hits positivos verdaderos. Por consiguiente, la presente invención se refiere al uso de la célula de levadura, tal como se caracteriza en las reivindicaciones 1 a 3, para el cribado de compuestos capaces de afectar a la toxicidad de proteínas amiloidogénicas en levadura.

De este modo, la presente invención se refiere a un procedimiento para identificar compuestos que modulan los efectos tóxicos de proteínas amiloidogénicas, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

a) proporcionar una cepa de levadura manipulada, que comprende un transgén que codifica una o más proteínas amiloidogénicas o un mutante o mutantes de las mismas, en la que dicha cepa de levadura se caracteriza porque carece de un gen funcional Yca1. Aquí, la proteína o proteínas amiloidogénicas pueden ser codificadas por un minigén.

b) poner en contacto la cepa de levadura obtenida en la etapa (a) con dicho compuesto, y

c) determinar el efecto fenotípico de dicho compuesto en dicha levadura.

Las realizaciones específicas de este procedimiento se describen en las reivindicaciones 8 y 9.

Descripción detallada de la invención

La presente solicitud describe un modelo de levadura que recapitula los efectos neurotóxicos de proteínas amiloidogénicas. Este modelo consiste en células de levadura en las que una o más proteínas amiloidogénicas se expresan de manera heteróloga y mediante esta expresión tienen un efecto fenotípico en las células de levadura, de manera que se puede ensayar la influencia de diferentes compuestos o grupos de compuestos u otras moléculas sobre la expresión o la actividad de las proteínas amiloidogénicas en este efecto fenotípico. Con el fin de obtener dicha lectura fenotípica, la proteína amiloidogénica se expresa en una base genética específica que consiste en cepas de levadura que portan mutaciones en uno o más genes de levadura funcionales y/o se expresan uno o más genes heterólogos. Más particularmente, se observó que las mutaciones en genes sensibles al estrés oxidativo sensibilizaban significativamente la levadura a la expresión de las proteínas amiloidogénicas. La cepa resultante se desarrolla en medios clásicos o en medios desarrollados específicamente, incluyendo medios tales como, pero sin limitarse a, medios que inducen el estrés oxidativo a través de la presencia de iones metálicos, paraquat, rotenona u otros estresantes oxidativos.

De este modo, la presente solicitud describe células de levadura mutantes que muestran una mayor toxicidad hacia proteínas amiloidogénicas implicadas en la neurodegeneración.

El término “*modelo*” tal como se utiliza en la presente invención se refiere a un sistema que mimetiza por lo menos un aspecto del proceso de interés. Más particularmente, en el contexto de la presente invención, se proporcionan células de levadura en las que la expresión de proteínas amiloidogénicas da lugar a un fenotipo que es similar al observado en ciertas células del cerebro en trastornos de amiloidosis humana y animal.

El término “*célula de levadura*” se utiliza en la presente invención para mencionar hongos unicelulares de la phylum Ascomycota que se reproducen mediante fisión o germinación y son capaces de fermentar carbohidratos en alcohol y dióxido de carbono. Preferiblemente, dichas células de levadura son *Saccharomycetales* o *Schizosaccharomycetales*, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida*, o *Pichia*. Más preferiblemente, las células de levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae* se utilizan para la manipulación según la presente invención. A una célula de levadura genéticamente estable también se hace referencia como una cepa de levadura.

En el contexto de la presente invención, las células de levadura “*que carecen de uno o más genes funcionales*” son cepas de levadura en las que uno o más genes no se pueden expresar (no hay producto génico) o que expresa un producto génico aberrante, es decir, un producto que no es el producto génico natural. Preferiblemente, según

la presente invención, dicho producto génico aberrante es un producto génico que ha perdido su función original (tal como está presente en la cepa natural). Alternativamente, dicho producto génico aberrante tiene una función reducida (menos de un 50%, menos de un 75%, o incluso menos de un 90%) cuando se compara con la función natural (actividad enzimática, afinidad de unión, etc.). Las células o cepas de levadura que carecen de uno o más genes funcionales pueden ser el resultado de diferentes factores, tales como, pero sin limitarse a, una o más mutaciones en el propio gen o en un gen que codifica un factor (proteína, ARN, dsARN) que es capaz de modificar la expresión de dicho gen; una truncación (causada, por ejemplo, por la expresión aberrante de una enzima capaz de degradar dicha proteína); la ausencia completa de un gen; la inserción de un transposón; la expresión de un transgén (que da lugar a una expresión sin sentido, antisentido, en sentido) que modifica la expresión o la actividad del producto génico natural (ver a continuación).

Una “*cepa de levadura mutante*” se refiere a una cepa que, como resultado de procesos naturales o técnicas de mutagénesis que incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis dirigida de sitio, contiene una o más mutaciones (eliminaciones, inserciones y/o sustituciones) en su genoma en comparación con la cepa natural (utilizada para su clasificación taxonómica). Las realizaciones preferidas de dichas cepas mutantes según la presente invención son cepas (de levadura) con eliminación, más particularmente, cepas con eliminación que comprenden una o más eliminaciones en uno o más genes sensibles al estrés oxidativo, dando lugar a la cepa que carece de uno o más genes funcionales sensibles al estrés oxidativo. Un gen funcional, tal como se utiliza en la presente invención se refiere a un gen que es capaz de expresar su producto génico natural. Las realizaciones preferidas de dichas cepas con eliminación son las cepas *ycal*, que portan una o más eliminaciones para un homólogo en levaduras de la cascada de mamífero, tales como *YCA1* (codificado por ORF: YOR197W) y cepas *sod*, que portan una eliminación para un homólogo en levaduras de la superóxido dismutasa tales como SOD1 (cepa *sod1*) (codificada por ORF: YJR104C) o SOD2 (cepa *sod2*) (codificada por ORF: YHR008C). Otros ejemplos de genes que son sensibles al estrés oxidativo se revisan en Godon *et al.* J. Biol. Chem. 273 (1998) 22480-22489. En este extenso estudio se han identificado muchos genes que responden a H₂O₂.

Un ejemplo preferido de una cepa mutante *ycal* es la cepa mutante *ycal* descrita por Giaever *et al.* (2002) Nature 418, 387-391). Alternativamente, se pueden realizar eliminaciones genómicas de genes específicos en cepas de levadura adecuadas mediante procedimientos conocidos en la técnica, tales como, pero sin limitarse a, interrupciones génicas dirigidas con productos de PCR.

La presente solicitud se refiere a células de levadura que son defectuosas en uno o más genes que son sensibles al estrés oxidativo. Los genes sensibles al estrés oxidativo son genes que son regulados de manera positiva o negativa a nivel de la transcripción por un factor de como mínimo 2 como resultado del estrés oxidativo (Gash *et al.* (2000), Mol Biol Cell 11, 4241-4257) y/o cuya expresión del producto génico está influenciada por el estrés oxidativo y/o cuya actividad del producto génico (por ejemplo, actividad enzimática) está influenciada por el estrés oxidativo (tal como Yca1). Los compuestos habituales que provocan estrés oxidativo son, por ejemplo, peróxido de hidrógeno, diamida, menadiona, iones metálicos activos en Redox (Fe²⁺/Fe³⁺, Cu²⁺/Cu³⁺).

Según un aspecto particular de la presente invención, las células de levadura se manipulan para incorporar secuencias de ADN, más particularmente secuencias de ADN que codifican proteínas amiloidogénicas o partes de las mismas. Las células levadura normalmente no expresan proteínas amiloidogénicas humanas pero son capaces de expresar dichas proteínas mediante la introducción de una secuencia de ADN que las codifica bajo el control de secuencias de ADN reguladoras apropiadas. Alternativamente, las secuencias de ADN endógenas se pueden introducir bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas para obtener la sobreexpresión de genes endógenos. La secuencia de ADN resultante se considera una secuencia de ADN “*recombinante*” o un “*transgén*”. A la cepa de levadura que comprende el ADN recombinante integrado de manera estable en su genoma se le puede hacer referencia como una cepa de levadura de recombinante.

De este modo, el término “*transgén*” se refiere a cualquier trozo de ácido nucleico (ADN o ARN) que se ha insertado en una célula (por ejemplo, mediante transformación) y que se puede incorporar o no al genoma. Preferiblemente, el transgén se convierte en parte del genoma del organismo (es decir, se integra de manera estable o como un elemento extracromosómico estable). Dicho transgén incluye genes que son parcial o completamente heterólogos (es decir, exógenos), así como genes homólogos a genes endógenos del organismo. Incluido en esta definición está un transgén creado mediante la disociación de una secuencia de ADN que se transcribe de manera inversa en ADN y, a continuación, se incorpora en el genoma, o un agente o molécula antisentido. Dicho transgén puede codificar o no un producto génico y/o puede modificar la expresión de un producto génico endógeno. La secuencia de ácidos nucleicos se puede introducir mediante cualquier técnica de transformación adecuada incluyendo la electroporación, los procedimientos de transformación química, tales como el procedimiento del acetato de litio u otras técnicas conocidas por los expertos en la materia.

El término “*levadura manipulada*” se utiliza en la presente invención para mencionar células o cepas de levadura que tienen un transgén o una secuencia de ácidos nucleicos no endógena (es decir, heteróloga) presente como un elemento extracromosómico o integrada de manera estable en su ADN de la línea germinal (es decir, en el ADN en único).

Una “*proteína amiloidogénica*” tal como se utiliza en la presente invención se refiere a una proteína que está implicada en el depósito de fibras amiloides insolubles (a las que también se hace referencia específicamente como amiloidosis). Entre los ejemplos de dichas proteínas amiloidogénicas se incluyen, pero no se limitan a, huntingtina,

alfa-sinucleína, tau y ataxina de beta amiloide, SOD1, transtirretina, amiloide A en suero, polipéptido de amiloide de isleta, cistatina-C y lisozima. Más particularmente, las proteínas amiloidogénicas contempladas en el contexto de la presente invención son proteínas amiloidogénicas implicadas en enfermedades neurodegenerativas, tales como alfa-sinucleína, tau huntingtina y beta-amiloide.

El término “*alfa-sinucleína*” se refiere a la proteína presináptica que ha sido identificada como el componente principal en los cuerpos de Lewy en la enfermedad de Parkinson tanto hereditaria como esporádica.

El término “*gen de alfa-sinucleína*” se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína alfa-sinucleína, una isoforma u homólogo funcional de la misma, tal como el gen de NACP/alfa-sinucleína humano o una variante alélica o minigén de la misma.

Los términos “*tau*” o “*proteína tau*” se refieren a un (poli)péptido o proteína específica asociada con el ensamblaje, estabilidad o mejora de la polimerización de microtúbulos. La proteína tau existe en hasta 6 isoformas diferentes en el cerebro adulto humano, mientras que sólo 1 isoforma se expresa en cerebro fetal, pero todas se generan a partir de un único gen en el cromosoma 17 humano mediante ajuste (“splicing”) alternativo de ARNm. Tau existe en diversas formas fosforiladas tal como se revisa, por ejemplo, en Geschwind (2003) Neuron. 40, 457-460.

El término “*gen de tau*” tal como se utiliza en la presente invención se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína tau, una isoforma u homólogo funcional de la misma, tal como el gen que codifica httau40, o una variante alélica o minigén de la misma. Una realización particular se refiere a versiones mutadas que mimetizan versiones de tau fosforiladas o no fosforiladas.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término “*minigén*” se refiere a una construcción génica heteróloga en la que uno o más segmentos no esenciales de un gen se eliminan con respecto al gen natural. Habitualmente, los segmentos eliminados son secuencias intrónicas de por lo menos aproximadamente 100 pares de bases hasta varias kilobases, y pueden abarcar varias decenas de kilobases o más. El aislamiento y manipulación de grandes construcciones de reconocimiento (es decir, mayores a aproximadamente 50 kilobases) es frecuentemente difícil y puede reducir la eficacia de la transferencia de la construcción de reconocimiento a una célula huésped. De este modo, frecuentemente es deseable reducir el tamaño de una construcción de reconocimiento mediante la eliminación de una o más partes no esenciales del gen. Habitualmente, pueden eliminarse las secuencias intrónicas que no comprenden elementos reguladores esenciales. Frecuentemente, si los sitios de restricción adecuados están unidos a una secuencia intrónica no esencial de una secuencia génica clonada, se puede producir una eliminación de la secuencia intrónica mediante: (1) digestión del ADN clonado con las enzimas de restricción apropiadas, (2) separación de los fragmentos de restricción (por ejemplo, mediante electroforesis), (3) aislamiento de los fragmentos de restricción que comprenden los exones esenciales y elementos reguladores, y (4) unión de los fragmentos de restricción aislados para formar un minigén en el que los exones están en el mismo orden lineal que están presentes en la copia de la línea germinal del gen natural. Procedimientos alternativos para producir un minigén serán evidentes para los expertos en la materia (por ejemplo, unión de clones genómicos parciales, que comprenden exones esenciales pero que carecen de partes de la secuencia intrónica). Más habitualmente, los segmentos génicos que comprenden un minigén se dispondrán en el mismo orden lineal que están presentes en el gen de la línea germinal, aunque sin embargo, éste no siempre será el caso. Algunos elementos reguladores deseados (por ejemplo, potenciadores, silenciadores) pueden ser relativamente insensibles a la posición, de manera que el elemento regulador actuará correctamente incluso si está situado de manera diferente en un minigén que en el correspondiente gen de la línea germinal. Por ejemplo, un potenciador se puede localizar a una distancia diferente de un promotor, en una orientación diferente, y/o en un orden lineal diferente. Por ejemplo, un potenciador que está situado en 3' respecto al promotor en la configuración de la línea germinal podría estar situado en 5' con respecto al promotor en un minigén. De manera similar, algunos genes pueden tener exones, que están cortados y empalmados alternativamente, a nivel de ARN, y, de este modo, un minigén puede tener menos exones y/o exones en un orden lineal diferente que el correspondiente gen de la línea germinal y todavía codificar un producto génico funcional. Un ADNc que codifica un producto génico también se puede utilizar para construir un minigén. Sin embargo, dado que es frecuentemente deseable que el minigén heterólogo se exprese de manera similar al gen afín natural no humano, la transcripción del ADNc del minigén está impulsada habitualmente por un promotor del gen unido y un potenciador del gen natural. Frecuentemente, dicho minigén puede comprender una secuencia reguladora transcripcional (por ejemplo, un promotor y/o potenciador) que confiere una transcripción específica de neurona o transcripción específica de SNC de las secuencias codificantes de la alfa-sinucleína del minigén. En una realización particular de un minigén, se han eliminado todas las secuencias intrónicas.

Un “*gen mutante*” se refiere a un gen cuya secuencia ha sido alterada con respecto al gen natural (eliminaciones en N terminal, eliminaciones en C terminal, eliminaciones internas, sustituciones (silencios o cambios del aminoácido codificado) en una o más posiciones, y combinaciones de las mismas). Este término se utiliza principalmente en la presente invención en el contexto de genes que codifican proteínas amiloidogénicas humanas. Preferiblemente, según la presente invención, los genes mutantes se refieren a genes cuya secuencia codificante ha sido alterada con respecto al gen humano natural presente en condiciones no patológicas en células humanas. Dichos genes mutantes se pueden tener mediante diferentes procedimientos *in vitro* (o *in vivo*) incluyendo ingeniería genética o mutagénesis aleatoria o dirigida de sitio o puede ocurrir en la naturaleza, tal como mutantes clínicos. Las proteínas mutantes a las que se hace referencia en la presente invención son las proteínas codificadas por los respectivos genes mutantes. La presente invención se refiere, entre otras cosas, a la expresión en levaduras de genes mutantes de proteínas amiloidogénicas, tales como genes mutantes de alfa-sinucleína, que son preferiblemente mutaciones clínicas del gen de alfa-sinucleína, tales

como, pero sin limitarse a, A53T y A30P. En una realización particular, las mutaciones se introducen en posiciones que mimetizan o evitan las modificaciones posteriores a la traducción, tales como la fosforilación.

Un “*suplemento*” tal como se utiliza en la presente invención es un compuesto y se añade a medios de crecimiento de levaduras clásicos. Según la presente invención, los suplementos se disponen de manera que afectan al crecimiento de las células de levadura que expresan proteínas amiloidogénicas, tales como las descritas en la presente invención. Esto suplementos incluyen, pero no se limitan a, sales metálicas, tales como FeCl_3 , ZnCl_2 y paraquat.

Un “*efecto fenotípico*” tal como se utiliza la presente invención se refiere a un efecto sobre las células de levadura. Preferiblemente, este control se puede llevar a cabo directamente, más particularmente sin análisis molecular. Dichos efectos incluyen, pero no se limitan a, efectos sobre la supervivencia celular (efecto citotóxico) y la proliferación celular (inhibición del crecimiento) o la morfología, pero también efectos que se puede medir mediante la actividad de un gen informador o la actividad enzimática de una proteína informadora. Según la presente invención, la expresión en células de levadura de proteínas amiloidogénicas en cepas naturales o con eliminación tiene un efecto fenotípico particular sobre estas células. Según un aspecto particular de la presente invención, el efecto fenotípico observado en las cepas de levadura es un efecto sobre el crecimiento, más particularmente un efecto tóxico, que da lugar a una menor proliferación y muerte celular. Alternativamente, el control del efecto fenotípico se puede realizar indirectamente, es decir a través de un parámetro relacionado con el aumento del crecimiento. Algunos ejemplos de parámetros relacionados con el aumento del crecimiento son el consumo de componentes en el medio (aminoácidos, fuentes de carbono), nivel de metabolitos, o construcciones informadoras (por ejemplo, con enzimas metabólicas). Una construcción de gen informador (por ejemplo, un marcador de nutriente o un gen que codifica una enzima) tal como se utiliza en la presente invención se refiere a una secuencia de promotor de un gen de interés, es decir, cuya expresión va a controlarse, que está unida a una secuencia codificante cuya expresión es fácilmente detectable. Algunos ejemplos de dichas secuencias codificantes son secuencias que codifican una enzima (LacZ, digerida con X-gal se vuelve azul), o marcador de nutriente (tal como *HIS* o *LEU2* que codifican las enzimas biosintéticas necesarias para la producción de los aminoácidos histidina y leucina, respectivamente). Un gen informador puede ser un transgén (por ejemplo, LacZ) detrás de un promotor adecuado. El gen informador también puede ser un gen de levadura endógeno que está regulado de manera positiva o negativa. Las técnicas adecuadas para detectar la actividad de proteínas informadoras en las células son conocidas en el sector.

El término “*compuesto*” se utiliza en la presente invención para indicar una estructura química, una mezcla de estructuras químicas, un péptido, una sustancia biológica tal como una macromolécula, un extracto producido a partir de materiales biológicos tales como bacterias, plantas, hongos o células o tejidos animales (particularmente mamíferos). Según un aspecto de la presente invención, se proporcionan procedimientos para identificar compuestos capaces de influir, modificar (aumentar o disminuir) el efecto fenotípico de la expresión de proteínas amiloidogénicas en levadura. La influencia de un compuesto en el efecto fenotípico observado en células de levadura puede ser directa mediante la interacción con la proteína amiloidogénica expresada o puede ser indirecta mediante la afectación de la expresión de la proteína amiloidogénica en levadura o mediante la afectación de inhibidores o enzimas que por sí mismos influyen en el efecto fenotípico de las proteínas amiloidogénicas. Alternativamente, el efecto de estos compuestos puede ser mediante la interacción con proteínas o enzimas que median en el efecto fenotípico de la proteína amiloidogénica. Entre dichos compuestos se incluyen, pero no se limitan a, proteínas o polipéptidos (tales como proteínas del golpe de calor, receptores, enzimas, ligandos, proteínas nucleares o citoplasmáticas, chaperones, hormonas, antígenos, factores de crecimiento, proteínas reguladoras, proteínas estructurales), ácidos nucleicos (ARNs, ribozimas, ADNs o ADNcs) o compuestos químicos. También está previsto el cribado de compuestos de bibliotecas naturales o sintéticas. Las dianas de ADNc que codifican un ARN, proteína o polipéptido capaces de influir, modificar el efecto fenotípico de la expresión de proteínas amiloidogénicas en levadura se pueden identificar en el contexto de la presente invención mediante la transformación de una cepa de levadura con una biblioteca de ADNc, y el cribado del fenotipo de las colonias de levadura resultantes.

Un “*procedimiento de cribado*” tal como se utiliza la presente invención se refiere a un procedimiento para identificar compuestos específicos. Más particularmente, el procedimiento de cribado de la presente invención permite la identificación de compuestos en base a su capacidad de modular el efecto tóxico en levadura de la expresión de las proteínas amiloidogénicas. Los kits de cribado a los que se hace referencia la presente invención pueden comprender uno o más componentes de la invención tales como, pero sin limitarse a, la cepa de levadura mutante de la invención, la cepa de levadura mutante manipulada para expresar una o más proteínas amiloidogénicas, uno o más suplementos y opcionalmente reactivos para determinar dichos efectos fenotípicos, por ejemplo, reactivos para detectar la viabilidad de las células o reactivos para detectar la actividad de una proteína informadora enzimática.

Según la presente invención, el cribado se puede llevar a cabo de la siguiente manera: las células de levadura de la presente invención que expresan la proteína o proteínas amiloidogénicas muestran un efecto fenotípico particular. Las células de levadura se ponen en contacto con un medio que comprende el compuesto durante un tiempo específico bajo condiciones específicas y se evalúa el efecto fenotípico del compuesto sobre las células ya sea mediante medición directa de la viabilidad celular (por ejemplo, mediante la medición del crecimiento en medio sólido o mediante la medición de la DO) o mediante la detección de la actividad de una proteína informadora.

De este modo, la presente solicitud se refiere a un procedimiento para evaluar la actividad de sustancias candidatas como moduladores, más particularmente inhibidores, de la citotoxicidad de la expresión de una o más proteínas amiloidogénicas, cuyo procedimiento comprende las etapas de

ES 2 307 018 T3

a) proporcionar una cepa de levadura y carece de uno o más genes funcionales sensibles al estrés oxidativo

b) poner en contacto la cepa de levadura con un medio que comprende uno o más compuestos candidatos, así como con un medio de control

c) comparar el crecimiento de la cepa de levadura en presencia o ausencia de uno o más de los compuestos candidatos

d) determinar la actividad de uno o más de los compuestos candidatos, donde un cambio en el crecimiento o un parámetro relacionado con un cambio en el crecimiento en comparación con el control es una indicación de la modulación de la citotoxicidad por uno o más de los compuestos candidatos; y opcionalmente

e) seleccionar un compuesto que modula, preferiblemente inhibe, la citotoxicidad de la proteína o proteínas amiloidogénicas en la cepa de levadura.

Más particularmente, se reivindica un procedimiento para identificar un compuesto que influye en el efecto tóxico de proteínas amiloidogénicas en levadura, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

a) proporcionar una cepa de levadura manipulada, que comprende un transgén o un minigén que codifica una o más proteínas amiloidogénicas o un mutante o mutantes de las mismas, en la que la cepa de levadura se caracteriza porque carece de un gen funcional *Yca1*,

b) poner en contacto la cepa de levadura obtenida en la etapa (a) con el compuesto, y

c) determinar el efecto fenotípico del compuesto en la cepa de levadura.

Según una realización específica de la presente invención, el efecto de un compuesto sobre la toxicidad de proteínas amiloidogénicas en las células se puede determinar mediante el contacto de las células de levadura con un medio que comprende un compuesto 30°C durante un período de 24-48 horas. Se pueden depositar diluciones en serie de precultivos líquidos sobre medios sólidos con o sin el compuesto o compuestos seguido de una incubación de 24-48 horas a 30°C y la determinación de la densidad del cultivo celular a DO_{600} . El aumento de la velocidad de crecimiento en comparación con el control es indicativo de un compuesto (o combinación de los mismos) con un potencial como reductor de la toxicidad. De manera similar, un menor crecimiento es indicativo de uno o más compuestos que aumentan la toxicidad. Opcionalmente, también se añaden suplementos al medio, los cuales también pueden modular el efecto tóxico de la expresión de las proteínas amiloidogénicas. La levadura también se puede poner bajo estrés adicional mediante parámetros físicos tales como un aumento o disminución de la temperatura o un aumento de la presión. Dichos experimentos se pueden llevar a cabo a gran escala, mediante lo cual se prevé el cribado de grandes bibliotecas de compuestos. Según la presente invención, se presenta un procedimiento de cribado más sensible, permitiendo una identificación selectiva de compuestos que afectan a la toxicidad de las proteínas amiloidogénicas *per se* (y no compuestos que neutralizar los efectos de los reactivos que impulsan las fibrilas tales como iones metálicos, pero no suprimen la toxicidad de las proteínas amiloidogénicas). La mayor sensibilidad da lugar no sólo en un nivel de detección más bajo, que da lugar a menos falsos negativos, sino también en un ensayo más astringente reduce el número de falsos positivos. Se presupone un aumento en la sensibilidad para proteínas amiloidogénicas en comparación con una cepa de levadura que no carece de un gen funcional sensible al estrés oxidativo entre 2x y 50x, opcionalmente por lo menos 5x. De este modo, el presente modelo de levadura proporciona un procedimiento de cribado sensible, rentable y con un alto rendimiento para la identificación de compuestos útiles en el tratamiento, prevención y curación de enfermedades debidas al despliegue y/o agregación de proteínas amiloides.

La presente solicitud también prevé compuestos identificados mediante el procedimiento de cribado de la presente invención, siendo dichos compuestos utilizados para el tratamiento, prevención y curación de enfermedades debidas al despliegue y/o agregación de proteínas amiloides.

Las células de levadura de la presente invención pueden servir como modelos para enfermedades que implican proteínas amiloidogénicas (a las que también se hace referencia como “*enfermedades por agregación de proteínas*”). Una realización preferida de la presente invención se refiere a células de levadura como modelos para trastornos neurodegenerativos en los que están implicadas proteínas amiloidogénicas; estas condiciones incluyen, pero no se limitan a, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la neuropatía amiloide familiar, y encefalopatías espongiformes transmisibles. Por consiguiente, las células de levadura de la presente invención se pueden utilizar para el estudio de dichas condiciones y el cribado de agentes terapéuticos para dichas condiciones.

Un “*fragmento*” de una secuencia de molécula de ADN o proteína tal como se utiliza la presente invención se refiere a una secuencia truncada de la secuencia original (ácido nucleico o aminoácidos) a la que se hace referencia, que puede variar de longitud pero en la que el tamaño mínimo es suficiente para asegurar que la proteína (codificada) sea biológicamente activa, siendo el tamaño máximo no crítico.

La “*identidad de secuencia*” de dos secuencias tal como se utiliza en la presente invención se refiere al número de posiciones con idénticos nucleótidos o aminoácidos dividido por el número de nucleótidos o aminoácidos en la más corta de las secuencias, cuando las dos secuencias están alineadas. Preferiblemente, dicha identidad de secuencia es

superior al 70%-80%, preferiblemente 81-85%, más preferiblemente 86-90%, especialmente preferiblemente 91-95%, aún más preferiblemente 96-100%, más específicamente es el 100%.

Tal como se utiliza en la presente invención, “*que comprende*” debe interpretarse que especifica la presencia de las características indicadas, valores, etapas o componentes a los que se hace referencia, pero no excluye la presencia o adición de una o más características, valores, etapas o componentes, o grupos de los mismos. De este modo, por ejemplo, un ácido nucleico o proteína que comprende una secuencia de nucleótidos o aminoácidos puede comprender más nucleótidos o aminoácidos que los realmente citados, es decir pueden estar incluidos en un ácido nucleico o proteína más largos. Un gen quimérico que comprende una secuencia de ADN que está funcional o estructuralmente definida puede comprender secuencias de ADN adicionales, etc.

A menos que se indique lo contrario, todas las técnicas de recombinación de ADN se llevan a cabo según los protocolos estándar tal como se describen en Sambrook *et al.* (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY y en los Volúmenes 1 y 2 de Ausubel *et al.* (1994) Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols, USA. Los materiales y procedimientos estándar relativos a la genética de levaduras se describen en Methods in yeast genetics: a Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY.

Breve descripción de las figuras

La descripción detallada anteriormente, proporcionada a modo de ejemplo, pero sin intención de limitar la presente invención a realizaciones específicas descritas en la misma, se puede entender conjuntamente con las figuras que se acompaña, en las que:

Figura 1: Análisis Western de células de levadura que expresan el gen de alfa-sinucleína humana y versiones mutantes del mismo. 212T(V) se refiere a una cepa diploide (base genética W303-1A) transformada con un vector de control que no contiene el gen que codifica alfa-sinucleína o transformada con los plásmidos 212T-aSYN(WT), 212T-aSYN(A53T) y 212T-aSYN(A30P) que transportan ADNc de ADNC de alfa-sinucleína humana, o los mutantes clínicos alfa-sinucleína (A53T) y alfa-sinucleína (A30P), respectivamente.

Figura 2: Características del crecimiento de células de levadura que expresan el gen de alfa-sinucleína humana y versiones mutantes del mismo en medios sólido (A) o líquido (B) que contienen FeCl₃. Las mismas cepas se utilizan tal como se describen en la leyenda de la figura 1. En (B), las barras en blanco y en negro indican el crecimiento en presencia de 16 mM de ZnSO₄ y 2 mM de FeCl₃, respectivamente.

Figura 3: Características del crecimiento de la cepa natural *YCA1* (base BY4147) y la cepa *yca1*, una cepa isogénica con eliminación del gen *YCA1* que expresa el gen de alfa-sinucleína humana, según una realización de la presente invención, desarrolladas en medios sólido (A) o líquido (B) que contienen FeCl₃. 212T y aSYN se refieren a cepas transformadas con un vector de control y el plásmido 212T-aSYN que contiene ADNc de alfa-sinucleína, respectivamente.

Figura 4: características de un modelo de α -sinucleína-opatía basado en levadura en un dispositivo HTS. Los datos se representan como un gráfico de dispersión en el que los ejes X e Y representan los valores normalizados de cada compuesto obtenidos a partir de la pantalla 1 y 2, respectivamente. Las flechas “sinucleína” y “vector” se refieren al valor de crecimiento normalizado del control negativo (valor = 1) y el control positivo (valor = 3,5), respectivamente.

En la descripción y los ejemplos se hace referencia a las siguientes secuencias:

SEC ID No 1: cebador directo alfaSYN1-F

SEC ID No 2: cebador inverso alfaSYN2-R

Ejemplos

Metodologías generales utilizadas en la presente invención

Medios para levadura y condiciones de cultivo: Las células de levadura se cultivaron a 30°C en medios de levadura estándar tal como se describe en la bibliografía (Methods in Yeast Genetics, citada anteriormente). Para seleccionar los plásmidos de expresión de alfa-sinucleína tal como se describe en la presente invención se utilizó medio completo sintético (SC) suplementado con adenina y aminoácidos pero que carecía de uracilo. Para los estudios de toxicidad de los iones metálicos en cultivos líquidos, se añadieron al medio de 8 a 32 mM de ZnSO₄ (MERCK; cat No. 1.08883) o de 1 a 4 mM d FeCl₃ (Sigma-Aldrich; Cat. No. 20.792-6). El medio que contenía FeCl₃ se filtró antes de su uso. Las pruebas de crecimiento se iniciaron a una densidad celular correspondiente a una DO₆₀₀ de 0,1. Las pruebas de crecimiento se realizaron a 30°C en placas de microtitulación en volúmenes de 150 μ l con tiempos de incubación entre 24 h y 48 h. Los estudios de toxicidad sobre placas se realizaron depositando diluciones en serie de precultivos líquidos sobre un medio sólido que contenía 5 mM de FeCl₃, seguido de una incubación de 48 h a 30°C.

Construcciones de expresión de ADNc: El ADNc que codifica alfa-sinucleína humana natural y derivados mutantes que codifican sustituciones A53T y A30P se expresaron de manera constitutiva en células de levadura utilizando el promotor de la triosa fosfato isomerasa (*TPII*) y el terminador de alcohol deshidrogenasa (*ADH1*). Para este fin, se clonó un fragmento de ADN que contenía el terminador de *ADH1* en el sitio XhoI de pYX212 (R&D systems Europe Ltd., Reino Unido) dando lugar al plásmido 212T. Posteriormente, se generaron fragmentos de PCR codificando alfa-sinucleína humana y derivados mutantes con cebadores: alfaSYN1-F 5'-GAT CAG AAT TCC CAT GGA TGT ATT CAT GAA AGG ACT TTC-3' (SEC ID No. 1) y alfa-SYN2-R 5'-GAT CAA GAT CTCT CGA GTT AGG CTT CAG GTT CGT AGT CTT G-3' (SEC ID No. 2), utilizando como plantilla ADNc de alfa-sinucleína natural, alfa-sinucleína (A53T) y alfa-sinucleína (A30P). Estos fragmentos de PCR posteriormente se clonaron (NcoI/XhoI) en el vector 212T dando lugar a plásmidos 212T-aSYN(WT), 212T-aSYN(A53T) y 212T-aSYN(A30P). Estos plásmidos de expresión de alfa-sinucleína se transformaron en cepas de levadura apropiadas.

Cepas de levadura con eliminaciones: Giaever *et al.* (2002) Nature 418, 387-391 han descrito un gran número de mutantes por eliminación de las levaduras y están disponibles comercialmente, tales como un mutante *ycal* utilizado en los presentes ejemplos, en el que falta el ORF completo. Alternativamente, se pueden realizar eliminaciones genómicas de genes específicos en cepas de levadura adecuadas, tales como, pero sin limitarse a, la cepa W303-1A de *S. cerevisiae* (Thomas y Rothstein (1989), Cell 56: 619-630), la cepa BY4741 (Brachmann *et al.* (1998), Yeast 14: 115-132) o la cepa Σ 1278b (Kron, (1997) Trends Microbiol. 5: 450-454) mediante interrupción génica dirigida con productos de PCR tal como se ha descrito anteriormente (Brachmann *et al.* (1998), Yeast 14: 115-132) utilizando oligonucleótidos específicos y los vectores pRS como plantillas para marcadores seleccionables auxotróficos. Las eliminaciones se pueden comprobar a continuación mediante análisis de transferencia Southern (Sambrook *et al.* Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2nd edn. 1989; Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press) o mediante análisis con PCR.

Análisis Western: Los cultivos de células de levadura se desarrollaron hasta una DO_{600} de 2-3. Las células se recogieron mediante centrifugación, se lavaron en agua estéril y los gránulos se resuspendieron en un tampón de extracción que contenía 10 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM de NaCl, Tween 20 al 0,05%, glicerol al 10%, 5 mM de EDTA, 1 mM de DTT y una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete, Roche Molecular Biochemicals, Alemania) y se rompieron mediante centrifugación durante 5 minutos en presencia de partículas de vidrio. La suspensión resultante se centrifugó en una microcentrífuga a velocidad máxima y parte del sobrenadante resultante se recogió en un tampón de carga, se fraccionó mediante SDS-PAGE al 15% (7) y se transfirió a una membrana PVDF.

La inmunodetección de proteínas: se llevó a cabo utilizando anticuerpo monoclonal anti-alfa-sinucleína de ratón (Zymed Laboratories Inc., Estados Unidos) y anticuerpo policlonal IgG anti-ratón de asno conjugado fosfatasa alcalina (Rockland, Estados Unidos). Las proteínas se visualizaron utilizando comprimidos NBT/BCIP listos para usar (Roche) según las instrucciones del fabricante.

Ensayo de crecimiento: Experimentos de deposición: las células de levadura se desarrollaron de manera rutinaria durante toda la noche a 30°C a temperatura ambiente en medios selectivos hasta alcanzar la fase logarítmica o logarítmica tardía. La densidad celular se determinó utilizando un espectrofotómetro y se diluyó hasta una DO_{600} de 6. Se depositaron diluciones en serie de diez veces sobre los medios sólidos y se incubaron durante 48 horas a 30°C.

Ejemplo 1

Expresión de genes que codifican alfa-sinucleína humana y derivados mutantes de los mismos en levadura: plásmidos funcionales de expresión en levadura para alfa-sinucleína

Para demostrar que los genes de alfa-sinucleína, alfa-sinucleína (A53T) y alfa-sinucleína (A30P) se pueden expresar en levadura, se realizó un análisis Western sobre extractos de células de levadura transformadas con vectores de expresión de alfa-sinucleína para visualizar las correspondientes proteínas. Para la detección se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-alfa-sinucleína.

Resultados: Tal como se muestra en la figura 1, se obtuvo en levadura una expresión satisfactoria de alfa-sinucleína y sus derivados mutantes. Se observó que los niveles de expresión eran similares entre los derivados de alfa-sinucleína.

Ejemplo 2

La expresión de genes que codifican alfa-sinucleína humana y derivados mutantes de los mismos en levadura inhibe el crecimiento: citotoxicidad dependiente de hierro o zinc de alfa-sinucleína

Se investigó la influencia de los iones metálicos sobre el efecto de la expresión de alfa-sinucleína en la célula. Para este fin, se analizó el crecimiento de células de levadura que expresan genes que codifican alfa-sinucleína y versiones mutantes de las mismas en presencia de iones de zinc e iones de hierro en el medio de crecimiento.

Resultados: Las células de levadura que producían alfa-sinucleína mostraron una fuerte reducción del crecimiento en un medio de crecimiento sólido con 16 mM de iones de zinc (figura 2A). Este efecto se obtuvo especialmente por alfa-sinucleína, ya que se observó que el crecimiento de las cepas de control no se veía afectado de manera significativa por los iones de zinc. Además, se ensayó el crecimiento en medios líquidos (figura 2B). Las células que

producían alfa-sinucleína crecían más lentamente o incluso eran completamente inhibidas para el crecimiento en un medio suplementado con iones de zinc o hierro en relación con la cepa de control que no expresa el ADNc de alfa-sinucleína. Las células que producían alfa-sinucleína (A30P) parecían ser ligeramente menos sensibles a la presencia de iones de zinc en el medio. Aparte de eso, no se observan grandes diferencias entre las cepas que producen sinucleína natural y los derivados mutantes.

Ejemplo 3

Expresión del gen que codifica alfa-sinucleína humana en una cepa de levadura con yca1 eliminado: hipersensibilidad de alfa-sinucleína en células yca1

Para estudiar el efecto de la caspasa de levadura Yca1 sobre las propiedades de alfa-sinucleína en levadura, se expresó el gen que codifica alfa-sinucleína en mutantes *ycal* y se determinó el crecimiento sobre un medio de crecimiento que contenía iones de hierro (figura 3).

Resultados: las células *ycal* que producían alfa-sinucleína ("*ycal*(aSYN)") crecieron significativamente más despacio en ambos medios sólido y líquido sin los iones de hierro en relación con la correspondiente cepa natural que producía alfa-sinucleína ((aSYN) natural). Además, en un medio que contenían iones de hierro, el crecimiento de las células *ycal* que expresaban alfa-sinucleína se inhibía de manera más intensa que en la correspondiente cepa natural. Se observó que este efecto dependiente de Yca1 requería de la presencia específica de alfa-sinucleína intracelular, ya que las células *ycal* transformadas con el vector de control ("*ycal*(212T)") mostraron una velocidad de crecimiento similar o incluso una velocidad de crecimiento ligeramente mejor que las correspondientes cepas naturales de levadura ("(212T) natural"). De este modo, la ausencia de actividad de Yca1 hace que las células de levadura sean hipersensibles a alfa-sinucleína producida de manera intracelular.

Ejemplo 4

Valoración de un modelo basado en levadura de amiloidosis en cribados de alto rendimiento: Selección de compuestos que suprimen la toxicidad de α -sinucleína en levadura

La utilidad del modelo de levadura descrito se examinó en cribados de alto rendimiento. Para este fin, se ensayaron 500 compuestos individualmente para dirigir su capacidad para modular la toxicidad de α -sinucleína en células de levadura *ycal*. Las células de levadura se desarrollaron en placas de microtitulación de 96 pocillos y el crecimiento se controló mediante la medición de la DO a 600 nm. El medio de crecimiento contenía 2 mM de FeCl₃. Los compuestos se disolvieron en DMSO y se añadieron al medio de crecimiento a una concentración final de 10 μ g/ml. Cada placa de microtitulación contenía controles positivos y negativos para calcular el factor Z' con el fin de evaluar la calidad del ensayo de cada placa de microtitulación. Los controles de crecimiento positivos y negativos fueron células *ycal* transformadas con 212T(V) y 212T-aSYN(natural), respectivamente. Se cribaron 500 compuestos por duplicado (cribado 1 y 2). Los valores de DO₆₀₀ se normalizaron al control negativo y, de este modo, representan el crecimiento en relación a las células *ycal* que producen α -sinucleína.

El ensayo se realizó por duplicado y se determinó el efecto de cada compuesto sobre el crecimiento mediante la medición de la densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀). Las mediciones de DO₆₀₀ se normalizaron y se representaron como un gráfico de dispersión (figura 4). El factor Z' (Zhang *et al.* (1999) J. Biomol. Screen. 4, 67-73) se calculó para cada placa de microtitulación con el fin de obtener una valoración cuantitativa de la calidad del ensayo.

Resultados: El factor Z' promedio de cada placa se observó que era de por lo menos 0,70 o superior, indicando que el ensayo es robusto y reproducible y, por lo tanto, muy adecuado para los objetivos de cribado de alto rendimiento. De manera consistente, el ensayo de 500 compuestos dio lugar a valores de DO₆₀₀ altamente reproducibles para cada compuesto (figura 4). De manera destacada, este ensayo permitió la selección de compuestos que mejoraron el crecimiento de la cepa de levadura de manera significativa y reproducible.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante se muestra únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento de Patente Europea. Aunque se ha tenido una gran precaución a la hora de recopilar las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la Oficina Europea de Patentes declina cualquier responsabilidad al respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 02065136 A [0010]
- EP 03447184 A [0069].

Documentos que no son patentes citados en la descripción

- **TAYLOR** *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, vol. 99, 13972-4 [0002]
- 5 • **MILLER** *et al.* *Trends Pharmacol Sci*, 2003, vol. 24, 18-23 [0005]
- **SNYDER** *et al.* *J Biol Chem*, 2003, vol. 278, 11753-9 [0005]
- **BREDESEN**. *Neural notes* (Promega), 1999, vol. IV, 3-6 [0005]
- 10 • **STEECE-COLLIER** *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, vol. 99, 13972-13974 [0006]
- **BUSH**. *Curr Opin Chem Biol*, 2000, vol. 4, 184-91 [0006]
- 15 • **DAUER** *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, vol. 99, 14524-14529 [0007]
- **KIRIK** *et al.* *PNAS*, 2003, vol. 100, 2884-2889 [0008]
- **PENDLETON** *et al.* *J Pharm Exp Therapeut*, 2002, vol. 300, 91-96 [0008]
- 20 • **NEYSTAT** *et al.* *Neurosci Lett*, 2002, vol. 325, 119-123 [0009]
- **GODON** *et al.* *J. Biol. Chem*, 1998, vol. 273, 22480-22489 [0025]
- 25 • **GIAEVER** *et al.* *Nature*, 2002, vol. 418, 387-391 [0026] [0056]
- **GASH** *et al.* *Mol Biol Cell*, 2000, vol. 11, 4241-4257 [0027]
- **GESCHWIND**. *Neuron*, 2003, vol. 40, 457-460 [0034]
- 30 • **SAMBROOK** *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press*, 1989 [0051]
- Current Protocols in Molecular Biology. **AUSUBEL** *et al.* *Current Protocols*. 1994, vol. 1 and 2 [0051]
- 35 • Standard materials and methods relating to yeast genetics are described in *Methods in yeast genetics: a Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press* [0051]
- **THOMAS; ROTHSTEIN**. *Cell*, 1989, vol. 56, 619-630 [0056]
- 40 • **BRACHMANN** *et al.* *Yeast*, 1998, vol. 14, 115-132 [0056] [0056]
- **KRON**. *Trends Microbiol.*, 1997, vol. 5, 450-454 [0056]
- 45 • **SAMBROOK** *et al.* *Molecular Cloning, a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989 [0056]
- **ZHANG** *et al.* *J. Biomol. Screen.*, 1999, vol. 4, 67-73 [0067].

REIVINDICACIONES

1. Célula de levadura manipulada, que comprende un transgén que codifica una o más proteínas amiloidogénicas o un mutante o mutantes de las mismas, en la que dicha cepa de levadura se **caracteriza** porque carece de un gen de caspasa funcional Yca1.

2. Célula de levadura manipulada según la reivindicación 1, en la que una o más proteínas amiloidogénicas o un mutante o mutantes de las mismas son codificadas por un minigén.

3. Célula de levadura manipulada según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicha proteína amiloidogénica es alfa-sinucleína.

4. Uso de la célula de levadura manipulada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 como modelo para amiloidosis.

5. Uso según la reivindicación 4, en el que el modelo para amiloidosis es un modelo para la enfermedad de Parkinson o la enfermedad con cuerpos de Lewy.

6. Uso de la célula de levadura manipulada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para el cribado de compuestos capaces de afectar a la toxicidad de proteínas amiloidogénicas en levadura.

7. Procedimiento para identificar un compuesto que influye en el efecto tóxico de proteínas amiloidogénicas en levadura, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

a) proporcionar una cepa de levadura manipulada, que comprende un transgén o un minigén que codifica una o más proteínas amiloidogénicas o un mutante o mutantes de las mismas, en la que dicha cepa de levadura se **caracteriza** porque carece de un gen funcional Yca1,

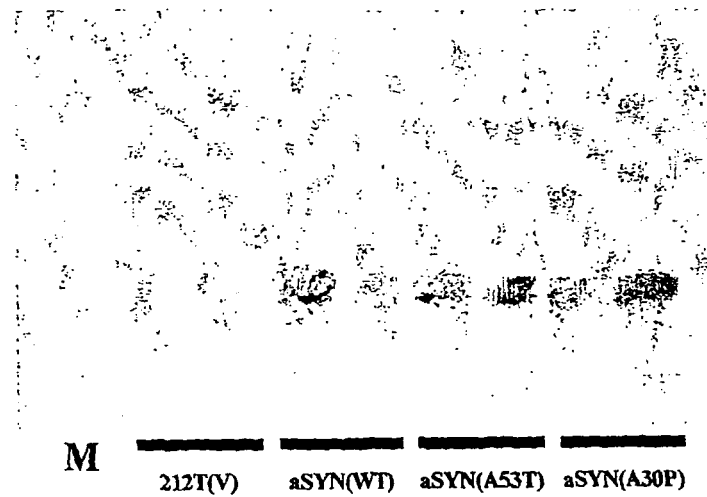
b) poner en contacto la cepa de levadura obtenida en la etapa (a) con dicho compuesto, y

c) determinar el efecto fenotípico de dicho compuesto en dicha levadura.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que la etapa b) se realiza en un medio que comprende iones metálicos.

9. Procedimiento según la reivindicación 7 u 8, en el que dicha proteína amiloidogénica es alfa-sinucleína.

W303 diploide



anti-aSYN

Figura 1

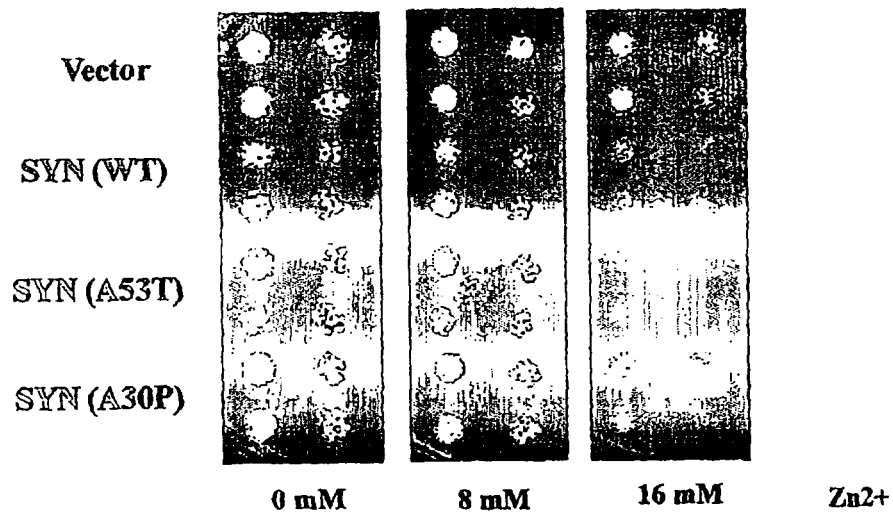


Figura 2A

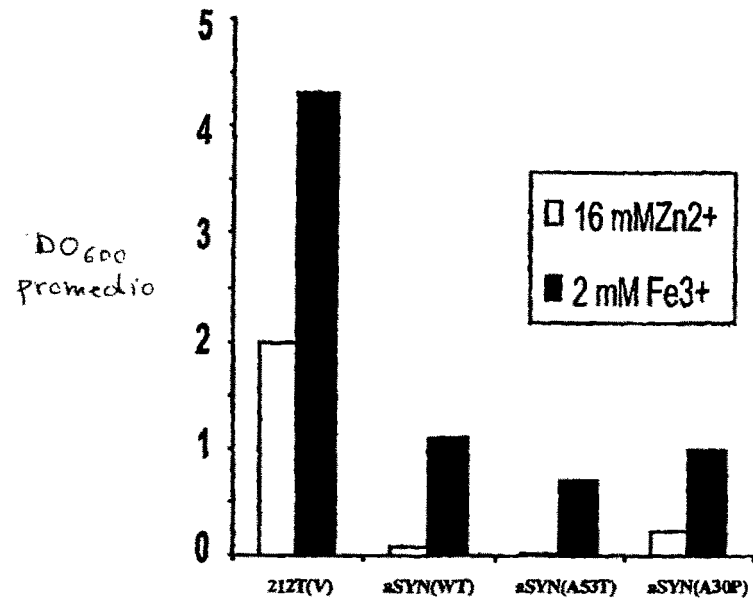


Figura 2B

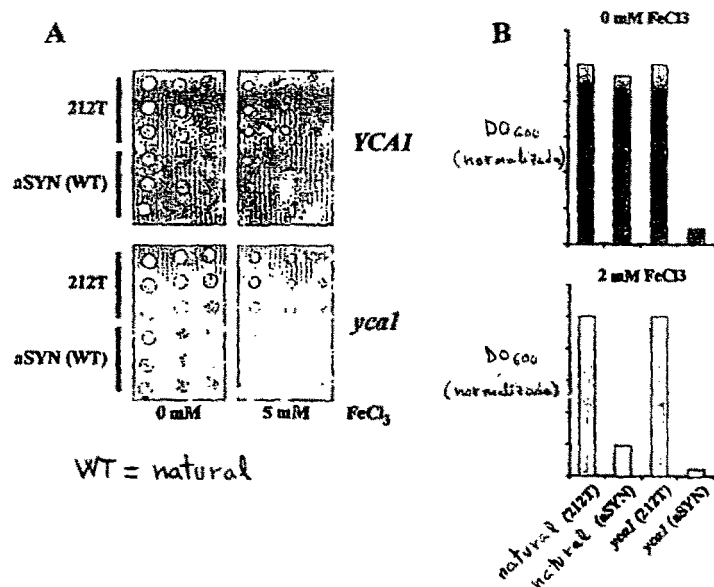


Figura 3

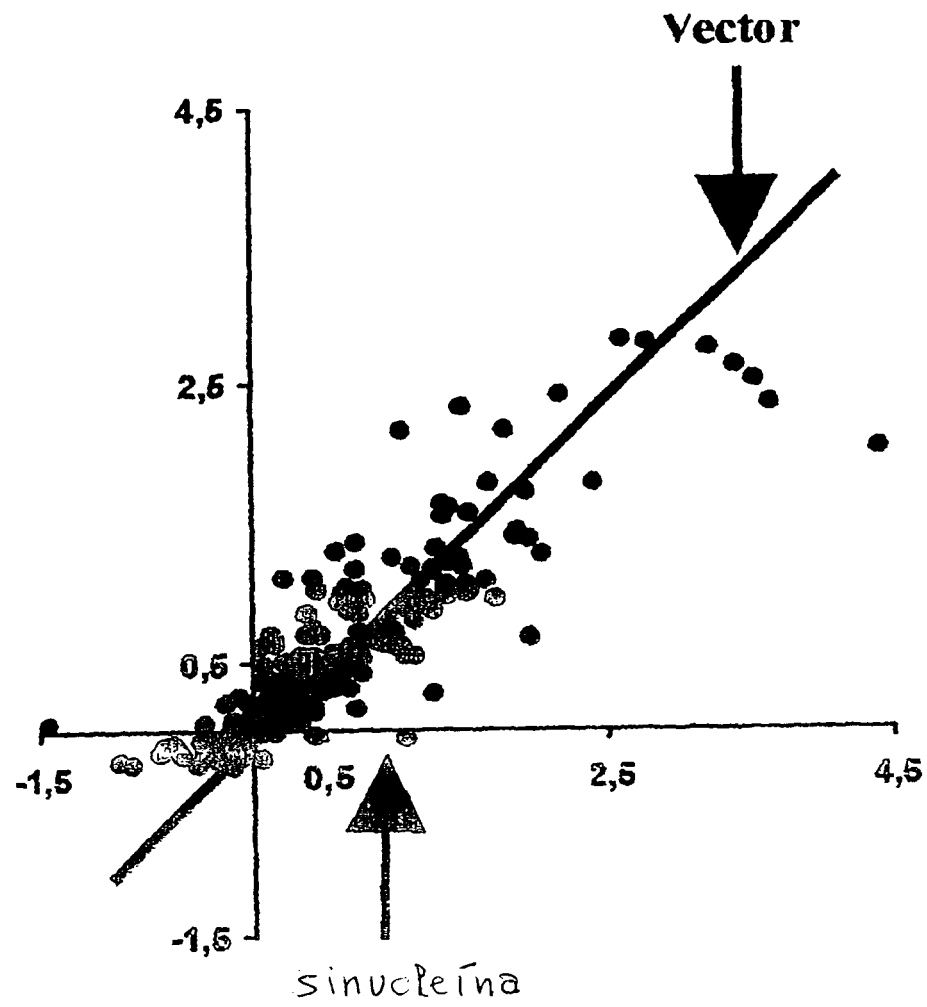


Figura 4

ES 2 307 018 T3

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> reMYND N.V. Griffioen, Gerard Duhamel, Hein van Damme, Nele Winderickx, Joris Wera, Stefaan	
10	<120> MODELO DE LEVADURA PARA LA TOXICIDAD DE PROTEÍNAS AMILOIDOGÉNICAS	
	<130> R2903-PCT	
15	<150> EP 03447184.7	
	<151> 2003-07-11	
20	<160> 2	
	<170> PatentIn version 3.1	
25	<210> 1	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> cebador directo de alfa-sinucleína	
	<400> 1	
35	gatcagaatt cccatggatg tattcatgaa aggacttc	39
	<210> 2	
40	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> cebador inverso de alfa-sinucleína	
	<400> 2	
50	gatcaagatc tctcgagtta ggcttcaggt tcgtagtctt g	41
55		
60		
65		