



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Grado en Biología

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

**Análisis del comportamiento priónico en la proteína
intrínsecamente desordenada Ixr1**

**Análise do comportamento priónico na proteína
intrínsecamente desordeada Ixr1**

**Analysis of the prion-like behaviour in the intrinsically
disordered protein Ixr1**

Pedro Sánchez García

Curso 2019-2020 | Convocatoria: Junio

Directores Académicos: Ángel José Vizoso Vázquez y M^a Esperanza Cerdán Villanueva

El Dr. Ángel J. Vizoso Vázquez, y la Dra. M^a Esperanza Cerdán Villanueva, profesores del Departamento de Biología de la Universidad da Coruña

INFORMAN:

Que el presente Trabajo Fin de Grado, realizado por Pedro Sánchez García, ha sido realizado bajo nuestra dirección y, considerándolo finalizado, damos el Visto Bueno para su presentación al Tribunal Calificador.

A Coruña, a 18 de Junio del 2020

Fdo.: Ángel J. Vizoso Vázquez

Fdo.: M^a Esperanza Cerdán Villanueva

Código Seguro De Verificación	yNz3kKmHSUapAUrcIPbSCw==	Estado	Data e hora	
Asinado Por	María Esperanza Cerdán Villanueva	Asinado	18/06/2020 17:14:35	
	Ángel José Vizoso Vázquez	Asinado	18/06/2020 15:53:41	
Observacións		Páxina	1/1	
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/yNz3kKmHSUapAUrcIPbSCw==			

ABREVIATURAS

ADN – Ácido desoxirribonucleico	mL – mililitros
BSA – Albúmina de suero bovino	mM – milimolar
CM – Medio de cultivo completo	µg – microgramos
CM-LEU – Medio de cultivo completo sin leucina	µL – microlitros
CM-URA – Medio de cultivo completo sin uracilo	µM - micromolar
CM-URA-LEU – Medio de cultivo completo sin uracilo y leucina	nm – nanómetros
CV – volumen de columna	OD₆₀₀ – Densidad óptica a 600 nm
dNTPs – desoxirribonucleótidos trifosfato	OMS – Organización Mundial de la Salud
DAB – Diaminobencidina	ORF – Pauta abierta de lectura
DTT – Ditioneitol	PBST – Tampón fosfato salino con Tween 20
EDTA – Ácido etilendiaminotetraacético	PCR – Reacción cadena de la polimerasa
EGFP – Variante de la proteína verde fluorescente	PEG3350 – Polietilenglicol 3350
FOA – Ácido 5-fluoroorótico	PFD – Dominio formador de priones
5-FUMP – 5-fluorouridina monofosfato	pH – Potencial de Hidrógeno
°C – Grados centígrados	PMSF – Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
GST – Glutación S-transferasa	rpm – revoluciones por minuto
HCl – Ácido clorhídrico	SDS-PAGE – Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
HMG – Dominio grupo de alta movilidad	TAE – Tris-Acetato-EDTA
IDRs - Regiones intrínsecamente desordenadas	TCEP – Tris(2-carboxietil) fosfina
IPTG – Isopropil β-D tiogalactopiranosido	TE – Tris-EDTA
λ - Longitud de onda	ThT – Tioflavina T
L - Litro	Tris HCl – Tris hidrocloreto
LB – Medio de cultivo Luria-Bertani	V - Voltios
LBA – Medio Luria-Bertani con ampicilina	YNB – Base nitrogenada para levaduras
M – Molar	YPD – Extracto de levadura con peptona y dextrosa
mg – miligramos	

RESUMEN

Los priones son isoformas de proteínas, que presentan un carácter infeccioso y que se generan debido a un plegamiento anormal y un proceso de agregación de estas. Son los agentes que provocan enfermedades neurodegenerativas como la encefalopatía espongiforme bovina, también denominada “mal de las vacas locas”, que produjo considerables pérdidas en la industria ganadera europea. A pesar de que la normativa establecida por la Comisión Europea permitió una notable reducción de casos, todavía se descubren formas de transmisión no descritas anteriormente, que han hecho que los priones sean objeto de numerosas investigaciones, en las que se emplean levaduras como organismo modelo debido a las ventajas que proporcionan. Los priones presentan una conformación estructural amiloide como resultado de un fenómeno de agregación proteica, que es más frecuente en aquellas proteínas con regiones intrínsecamente desordenadas ricas en aminoácidos polares como glutamina y alanina. En el presente trabajo, se analizó la posible formación de amiloides y el comportamiento como prión de la proteína Ixr1 de la levadura *Kluyveromyces lactis*. Para ello, se clonaron y purificaron diferentes regiones de la proteína en cuestión para llevar a cabo ensayos de formación de amiloides *in vitro* y analizar el comportamiento de las mismas a través de ensayos *in vivo*. Los resultados obtenidos sugieren que la región IQA es capaz de formar amiloides *in vitro*. No obstante, los agregados formados en ensayos *in vivo* no muestran resistencia a condiciones semidesnaturalizantes en presencia de SDS.

Palabras clave: priones, levaduras, amiloides, agregación proteica, Ixr1, regiones intrínsecamente desordenadas.

RESUMO

Os prions son isoformas de proteínas, que presentan un carácter infeccioso e que se xeran debido a un plegamiento anormal e un proceso de agregación destas. Son os axentes que provocan enfermidades neurodexenerativas como a encefalopatía esponxiforme bovina, tamén denominada “mal das vacas tolas”, que produciu considerables perdas na industria gandeira europea. A pesar de que a normativa establecida pola Comisión Europea permitiu unha notable redución de casos, aínda se descubren formas de transmisión non descritas anteriormente, que fixeron que os prións sexan obxecto de numerosas investigacións, nas que se empregan lévedos como organismo modelo debido ás vantaxes que proporcionan. Os prións presentan unha conformación estrutural amiloide como resultado dun fenómeno de agregación proteica, que é máis frecuente naquelas proteínas con rexións intrínsecamente desordeadas ricas en aminoácidos polares como glutamina e alanina. No presente traballo, analizouse a posible formación de amiloides e o comportamento como prión da proteína Ixr1 do lévedo *Kluyveromyces lactis*. Para iso, clonáronse e purificáronse diferentes rexións da proteína en cuestión para levar a cabo ensaios de formación de amiloides *in vitro* e analizar o comportamento das mesmas a través de ensaios *in vivo*. Os resultados obtidos suxiren que a rexión IQA é capaz de formar amiloides *in vitro*. Con todo, os agregados formados en ensaios *in vivo* non mostraron resistencia a condicións semidesnaturalizantes en presenza de SDS.

Palabras crave: prions, lévedos, amiloides, agregación proteica, Ixr1, rexións intrínsecamente desordeadas.

ABSTRACT

Prions are isoforms of proteins, which have an infectious behaviour and are generated due to abnormal folding and an aggregation process of these. They are the agents that cause neurodegenerative diseases such as bovine spongiform encephalopathy, also called "mad cow disease", which produced considerable losses in the European livestock industry. Despite the fact that the regulatory statements established by the European Commission allowed a notable reduction in cases, transmission forms not previously described are still discovered, which have made prions the subject of numerous investigations, and in which yeasts are used as a model organism due to the advantages they provide. Prions have a structural conformation of amyloids as a result of protein aggregation, which is more frequent in those proteins with intrinsically disordered regions rich in polar amino acids such as glutamine and alanine. In the present work, the possible formation of amyloids and the behavior as a prion of the Ixr1 protein of the yeast *Kluyveromyces lactis* were analyzed. To do this, different regions of the protein in question were cloned and purified to carry out *in vitro* amyloid formation assays and to analyze their behavior through *in vivo* assays. The results obtained suggest that the IQA region is capable of forming amyloids *in vitro*. However, the aggregates formed in the *in vivo* tests do not show resistance to semi-denaturing conditions in the presence of SDS.

Key words: prions, yeasts, amyloids, protein aggregation, Ixr1, intrinsically disordered regions.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	5
MATERIAL Y MÉTODOS	6
1. Cepas	6
2. Plásmidos	6
3. Medios de cultivo	8
4. Amplificación de las IDRs de estudio de <i>lxr1</i>	8
5. Inserción de las IDRs de estudio de <i>lxr1</i> en los plásmidos	9
6. Obtención de ADN plasmídico	11
7. Cuantificación del ADN plasmídico	11
8. Transformaciones	11
9. Estudio de la formación de amiloides in vitro	12
10. Estudio de la formación de amiloides in vivo	14
11. Herramientas bioinformáticas	15
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
1. Proteína de estudio	16
2. Cuantificación del ADN plasmídico	17
3. Estudio de la formación de amiloides in vitro	17
4. Estudio de la formación de amiloides in vivo	19
CONCLUSIONES	20
CONCLUSIÓN	21
CONCLUSIONS	21
BIBLIOGRAFÍA	21
ANEXO I	26

INTRODUCCIÓN

El término prión, acuñado por Stanley B. Prusiner, hace referencia a isoformas de proteínas, capaces de autorreplicarse y de naturaleza infecciosa (Chernova, Chernoff, & Wilkinson, 2019), que surgen como resultado de un plegamiento anormal y de un proceso de agregación en las mismas (D'Argenio & Sarnataro, 2019). Son los agentes causantes de enfermedades neurodegenerativas como la encefalopatía espongiforme bovina y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en humanos (Yamaguchi & Kuwata, 2018) (Houston & Andréoletti, 2019). Éstas se deben a que la proteína PrP^C, que se ubica en la membrana celular de las neuronas a través del glicosilfosfatidilinositol y se expresa principalmente en tejido nervioso y linfático, sufre un cambio conformacional, generándose una isoforma PrP^{Sc} priónica (**Figura 1**) resistente a la proteólisis, capaz de reclutar a las demás proteínas PrP^C, transformándolas en PrP^{Sc} y que se acumula en el tejido cerebral como agregados en forma de placas (Makarava *et al.*, 2011).

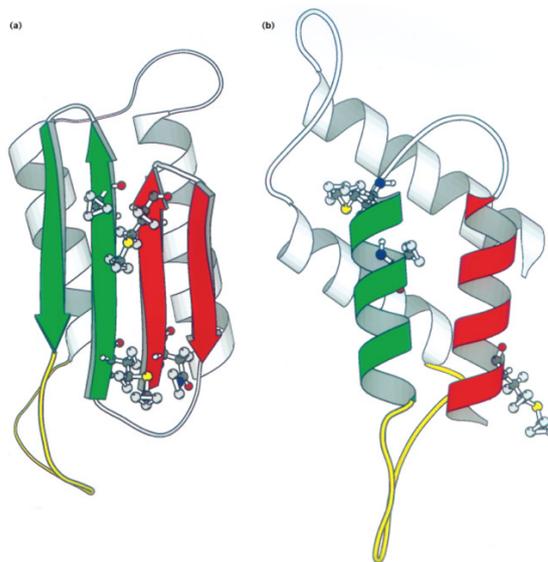


Figura 1. (a) Modelo de estructura terciaria de PrP^{Sc}, que contiene cuatro láminas beta y dos hélices alfa. (b) Modelo de estructura terciaria de PrP^C, que contiene cuatro hélices alfa (Huang, Prusiner, & Cohen, 1996).

Los priones representaron un desafío para la medicina, pues se trataba de un agente infeccioso sin caracterizar. La encefalopatía espongiforme bovina, conocida comúnmente como “mal de las vacas locas” provocó grandes pérdidas en la industria ganadera europea, así como un impacto social, desde que surgió en 1986 en Reino Unido (Sigurdson, 2016). Posee un periodo de incubación de entre 3 meses y 2 años, siendo los síntomas más comunes la falta de coordinación motora en las extremidades, un comportamiento inusualmente nervioso o agresivo y la pérdida considerable de peso corporal. Las investigaciones realizadas determinaron que las harinas de carne y hueso procedentes de bovinos empleadas como piensos, eran el vehículo para la transmisión (Ferreira *et al.*, 2019). En consecuencia, la regulación (EC) 99:2001 estableció la prohibición de estas harinas para la alimentación del ganado, así como la realización, en la mayor brevedad posible, de observaciones al microscopio y ensayos inmunohistoquímicos de tejido cerebral (**Figura 2**) de aquellos ejemplares que presentasen síntomas característicos.

La ingesta de carne procedente de ganado bovino que presentaba encefalopatía espongiforme transmisible produce la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en humanos, la cual también puede tener un origen esporádico, del que se da un caso por millón de habitantes (Houston & Andréoletti, 2019). La sintomatología consiste en la pérdida de audición y de visión, demencia y convulsiones, y suele incidir principalmente en personas con edades superiores a los 60-70 años (Houston & Andréoletti, 2019). En la actualidad, el número de casos con esta enfermedad se han reducido de manera drástica debido al cumplimiento de la normativa y de los protocolos de los

diferentes países para el control de la encefalopatía espongiforme transmisible en ganado bovino. Sin embargo, todavía se descubren nuevas formas de transmisión, como a través de injertos de hueso bovino empleado en cirugía oral (Kim, Nowzari, & Rich, 2013) o el uso de material quirúrgico como electrodos que no se han esterilizado según el protocolo establecido por la OMS en cirugías cerebrales (Hochmann, Coelho, & Salamano, 2012).

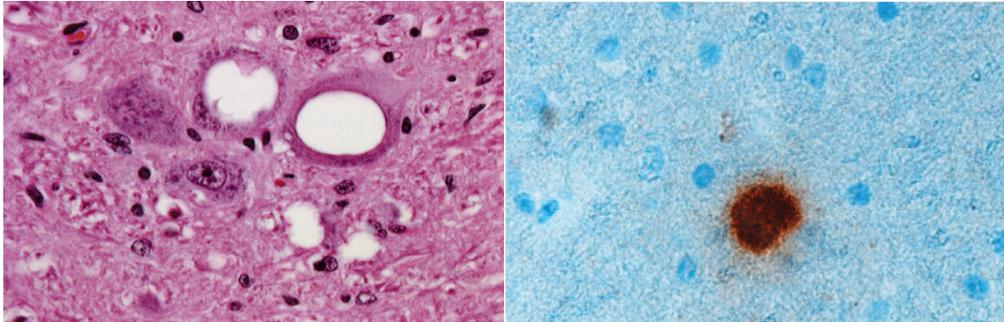
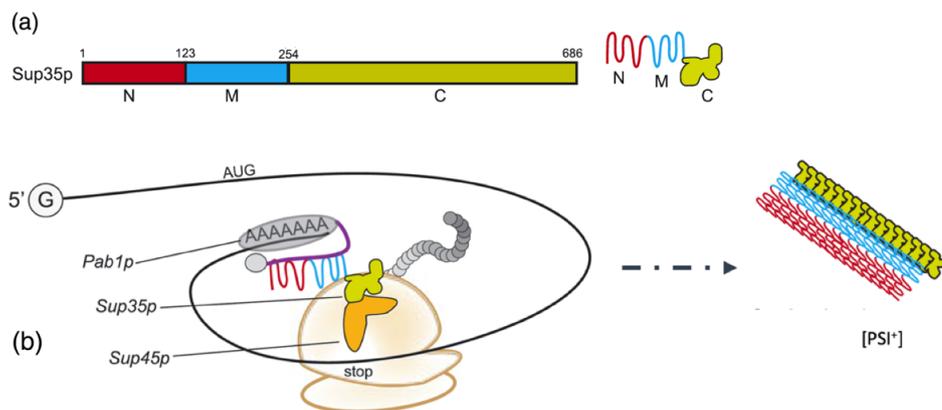


Figura 2. (Izquierda) Imagen a microscopio en la que se aprecia el aspecto espongiforme en materia gris cerebral de un ejemplar bovino que padece la encefalopatía espongiforme transmisible. (Derecha) Ensayo inmunohistoquímico en el que se observan placas cerebrales generadas por PrP^{Sc} (Seurberlich, Heim & Zurbriggen, 2010)

Es por ello que los priones han sido objeto de intensas investigaciones en las últimas décadas. En este sentido, es muy frecuente el uso de levaduras como organismo modelo útil para el estudio de los mecanismos de formación, propagación y para su tratamiento. Se trata de un organismo unicelular eucariota que presenta fenómenos de formación de priones de forma natural, además de poseer propiedades biológicas muy ventajosas, como tiempos de duplicación celular bajos, bajos costes de cultivo y facilidad a la hora de manejar y modificar su genoma (Chernova *et al.*, 2019). [PSI⁺] es el príon mejor caracterizado de levaduras. Es la isoforma agregada de la proteína Sup35, una proteína esencial en levaduras que, junto con Sup45, constituyen el complejo de terminación de la traducción. Sup35 posee una región globular carboxilo terminal imprescindible para llevar a cabo su función en la terminación de la traducción, una región intermedia con abundantes residuos con carga como lisinas y un dominio amino terminal rico en glutaminas necesario para el mantenimiento de [PSI⁺] (**Figura 3a**). La formación de [PSI⁺] se ve facilitada por diversas condiciones como una incubación prolongada a baja temperatura, estrés por calor, estrés osmótico y oxidativo (**Figura 3b**) (Chernova *et al.*, 2019).

Figura 3. (a) Regiones de Sup35: Amino terminal (1-123; rojo), intermedia (124-254; azul) y carboxilo terminal (255-686; verde). A la derecha se muestra el símbolo para la representación de Sup35 en su forma soluble. (b) Representación del factor Sup35 en su forma soluble y en la forma priónica [PSI⁺] (Esquema modificado de Lyke, Dorweiler, & Manogaran, 2019).



La conversión a la forma priónica por parte de Sup35 hace que se altere la terminación de la traducción, como consecuencia de una reducción en los niveles de proteína funcional disponible. Esto da lugar a una lectura menos frecuente de los codones de terminación por parte de los ribosomas durante el proceso de traducción, de multitud de genes involucrados en diversos procesos celulares, generándose una alteración de la expresión génica, que trae consigo una variedad de fenotipos dominantes que se transmiten por vía citoplasmática siguiendo un patrón de herencia no mendeliano (**Figura 4**) (Odani *et al.*, 2015). De esta forma, las levaduras amplían sus mecanismos y vías de variabilidad fenotípica, mejorando notablemente la respuesta frente a cambios en el ambiente y su supervivencia (Liebman & Chernoff, 2012; Chernova, Chernoff, & Wilkinson, 2017).

La agregación que sufren la mayoría de las proteínas prionogénicas da lugar a una conformación estructural de tipo amiloide (Liberta *et al.*, 2019). Los amiloides se caracterizan por ser un tipo de agregación insoluble pero ordenada de proteínas, con regiones intrínsecamente desordenadas carentes de un plegamiento definido (Lee & Terentiev, 2017). Su formación implica una reordenación estructural del estado nativo de las mismas, en una conformación rica en láminas beta (**Figura 5**) (Biza *et al.*, 2017). Estas láminas beta se disponen de manera paralela al eje de crecimiento de cada fibrilla amiloide, mientras que las hebras beta lo hacen perpendicularmente (Kumar & Udgaonkar, 2010). Los puentes de hidrógeno formados a lo largo del eje de la fibrilla entre las láminas beta, otorgan una gran estabilidad a los amiloides (Alberti, Halfmann, King, Kapila, & Lindquist, 2009; Sawaya *et al.*, 2007).

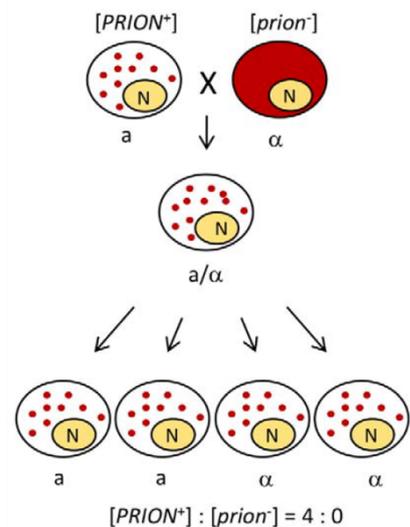


Figura 4. Transmisión de priones en levaduras. El cruce de células $[PSI^+]$ y $[psi^-]$ da como resultado un diploide $[PSI^+]$, que sufre meiosis, generando cuatro esporas, todas ellas $[PSI^+]$ (Li & Kowal, 2012).

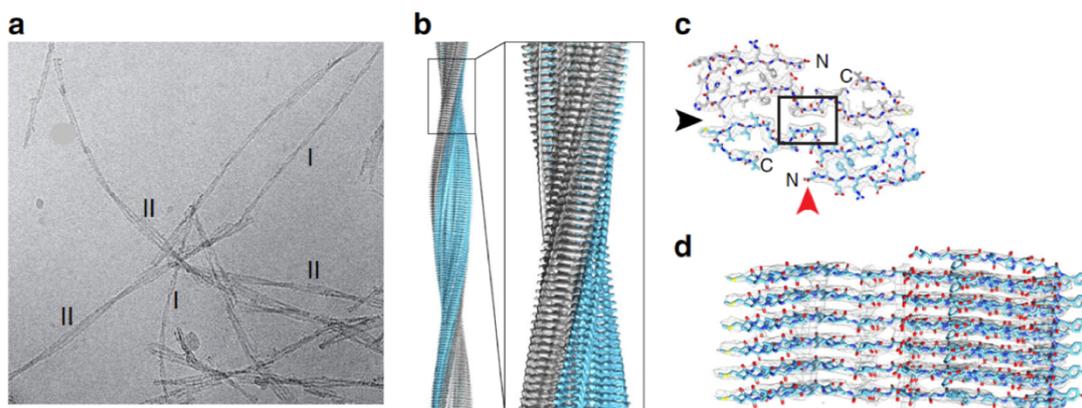


Figura 5. (a) Micrografía de crío-microscopía electrónica indicando fibrillas amiloides con diferentes morfologías I y II. (b) Vista lateral de una fibrilla amiloide. (c) Sección transversal de una fibrilla amiloide. (d) Vista lateral de una región de una fibrilla amiloide en la que se observan las láminas beta altamente ordenadas unidas mediante puentes de Hidrógeno establecidos (Modificado de Kollmer *et al.*, 2019).

La agregación de proteínas se genera en condiciones fisiológicas normales en respuesta a condiciones de estrés, como temperaturas elevadas, presencia de metales pesados y estrés oxidativo, que afectan a la homeostasis y al plegamiento de las mismas (Muttathukattil & Reddy,

2016). Las proteínas que contienen regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs) son más propensas a la agregación (Breydo & Uversky, 2011). Los segmentos propensos a la agregación tienden a estar encerrados en la proteína nativa, mientras que en condiciones de estrés estos quedan expuestos y facilitan el proceso de agregación. La flexibilidad conformacional, una mayor superficie de interacción y la elevada especificidad que presentan las IDRs (Huang & Liu, 2009), hacen que estén implicadas en numerosos procesos biológicos como la regulación de la transcripción y del ciclo celular, señalización celular, reconocimiento molecular y ensamblaje de complejos proteicos. De hecho, se ha estimado que aproximadamente el 40% de las proteínas de eucariotas contienen regiones intrínsecamente desordenadas de más de 30 aminoácidos (Holt, Raynes, & Carver, 2019).

Ixr1 (*Intranstrand cross (X)-link recognition 1*), es una proteína de levaduras, que contiene dos regiones ricas en residuos de glutamina y alanina y dos dominios HMG de unión al ADN dispuestos en tándem, que interactúan con el surco menor (Vizoso-Vázquez *et al.*, 2012). *Ixr1* reconoce y se une de manera específica a los aductos covalentes formados por el fármaco antitumoral cisplatino (cis-diaminodicloroplatino (II)) con el ADN (**Figura 6**), bloqueando la reparación por escisión de los mismos y produciendo, en consecuencia, la muerte celular (McA'Nulty & Lippard, 1996; Fedorov, Kovaltzova, Peshekhonov, & Korolev, 2010).

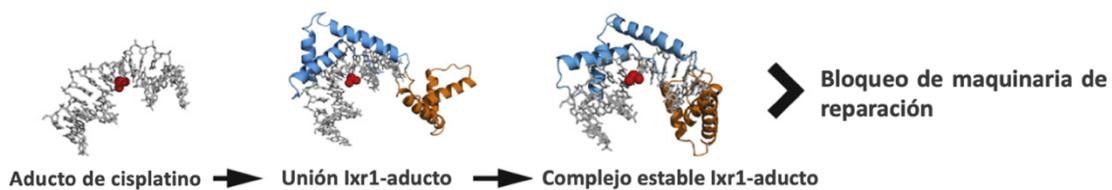


Figura 6. Modelo de unión de *Ixr1* a los aductos formados por el cisplatino, a través de los dominios HMG. Se forma un complejo estable que impide el acceso de la maquinaria de reparación del ADN (Modificado de Vizoso-Vázquez *et al.*, 2017).

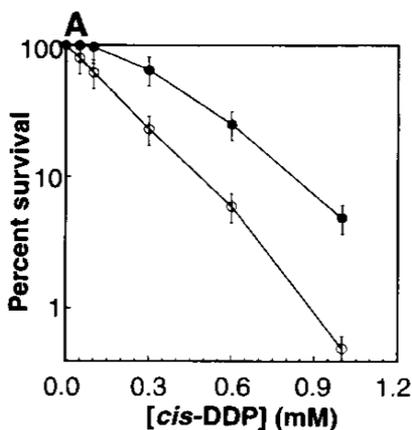


Figura 7. Citotoxicidad del cisplatino en cepas wild type (o) y mutante *ixr1* (●) de *S. cerevisiae*. El porcentaje de supervivencia en el rango de concentraciones de 0.3-0.9 mM de cisplatino es superior en la cepa mutante *ixr1* (Fedorov *et al.*, 2010).

Esta modulación de la citotoxicidad del fármaco se ha comprobado con el empleo de cepas mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, en las cuales se suprimió el gen que codifica para *Ixr1*, y se observó una mayor resistencia al fármaco debido a la reparación de los aductos por parte del complejo de reparación por escisión (**Figura 7**) (Fedorov *et al.*, 2010). Además, el cisplatino reduce la disponibilidad de *Ixr1* para la regulación de

factores de transcripción, como *Afb1*, *Sfp1* y *Crf1*, involucrados en el control de la síntesis y ensamblaje de ribosomas, afectando en consecuencia a la viabilidad celular (Martin, Soulard, & Hall, 2004; Cipollina *et al.*, 2008; Vizoso-Vázquez *et al.*, 2017; Fermi, Bosio, & Dieci, 2017).

En *S. cerevisiae*, *Ixr1* juega un papel importante en la regulación de la expresión de diversos genes hipóxicos en condiciones aeróbicas y en condiciones de hipoxia. Se ha descrito la existencia de una regulación cruzada entre *Ixr1* y el factor transcripcional *Rox1*, uno de los principales moduladores de la respuesta celular a los niveles de oxígeno disponibles. En este sentido, la

expresión del gen *IXR1* se encuentra reprimida por Rox1 (Castro-Prego *et al.*, 2009), mientras que en condiciones de hipoxia, *lxr1* reprime a Rox1 y permite la expresión de *HEM13*, que codifica para la protoporfirinógeno oxidasa, involucrada en la síntesis de hemo (Fedorov *et al.*, 2010). En ambas condiciones, *lxr1* regula la expresión de *TIR1*, que es una manoproteína de la pared celular de la familia Srp1p / Tip1p de proteínas ricas en serina / alanina (Bourdineaud, de Sampaio, & Lauquin, 2000). Otras funciones desempeñadas por *lxr1* son la regulación de genes implicados en la asimilación del sulfato, producción de α -cetoácidos, metabolismo de carbohidratos y respuesta al estrés oxidativo (Vizoso-Vázquez *et al.*, 2012), síntesis proteica a través del control en la formación de la maquinaria ribosomal (Vizoso-Vázquez, Lamas-Maceiras, González-Siso, & Cerdán, 2018), así como la expresión del gen que codifica para la ribonucleótido reductasa (Rnr), que cataliza la síntesis de dNTPs y mantiene unos niveles adecuados de los mismos (Ros-Carrero *et al.*, 2020).

Kluyveromyces lactis se ha convertido en las dos últimas décadas en una alternativa de gran utilidad al modelo eucariota clásico de *S. cerevisiae* para estudios relacionados con la respuesta a condiciones de estrés oxidativo e hipoxia, así como para diversas aplicaciones biotecnológicas (González-Siso, García-Leiro, Tarrío, & Cerdán, 2009). Presenta un metabolismo preferentemente respiratorio, incapaz de crecer en condiciones anaeróbicas y es *Cabtree* negativa, es decir, no es capaz de llevar a cabo la fermentación en condiciones aeróbicas (González-Siso *et al.*, 2000; Spohner, Schaum, Quitmann, & Czermak, 2016). Se trata de un género previo a la gran duplicación del genoma de levaduras (WGD, Whole Genome Duplication) del que derivó *S. cerevisiae*, con duplicidad en muchos de sus genes que constituyen la base para muchas de sus características, entre ellas la capacidad de crecer en condiciones de anaerobiosis. A diferencia de *S. cerevisiae*, Rox1 de *K. lactis* no actúa como principal elemento regulador del regulón de respuesta y adaptación a los niveles de oxígeno. Por otro lado, no se ha reportado hasta la fecha ningún trabajo que estudie el papel de *lxr1* en *K. lactis*, tanto en su papel como regulador transcripcional ni en sus capacidades de formar estructuras amiloides y comportamiento priónico. Es por ello que resulta de interés llevar a cabo el presente trabajo, que se va a centrar en realizar una primera aproximación experimental a las propiedades estructurales de *lxr1* de *K. lactis*.

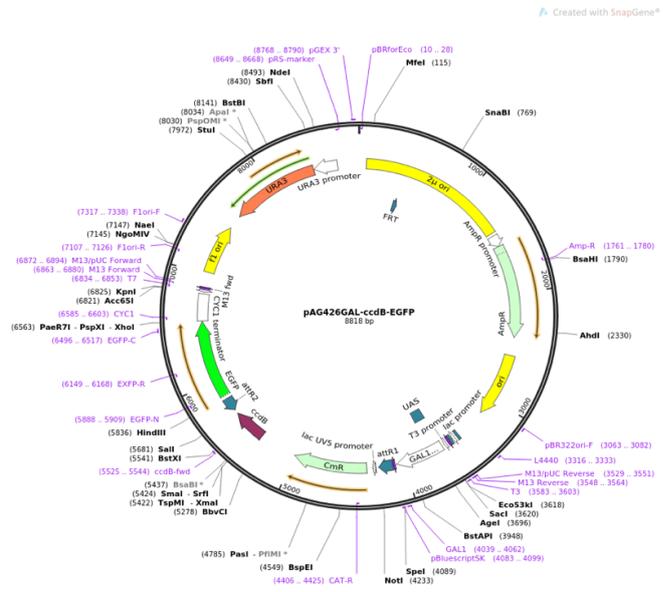
OBJETIVOS

El presente trabajo tiene como objetivo principal estudiar la posible formación de amiloides y el comportamiento como prión en la proteína *lxr1* de la levadura *K. lactis*. Para ello, se establecieron los siguientes objetivos concretos:

- I. Realización de ensayos *in vitro* para la clonación y purificación de distintas IDRs con potencial de formar amiloides
- II. Realización de ensayos *in vivo* que comprenden la sobreexpresión heteróloga de las distintas IDRs en células de *S. cerevisiae*, así como el análisis de su comportamiento mediante microscopía fluorescente y ensayos de cito-transformación.

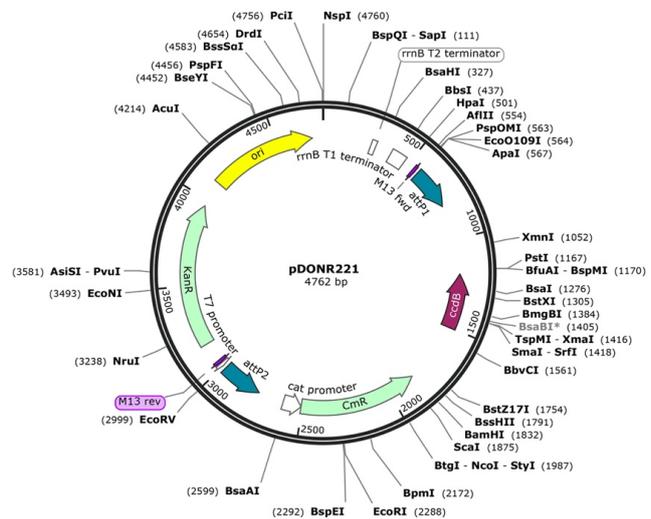
pAG426GAL-ccdB-EGFP (addgene)

Plásmido de expresión en el que el clon insertado está bajo el control del promotor GAL1, el cual es inducible por galactosa y reprimido por glucosa. Contiene el marcador de selección *URA3* para la selección por auxotrofia en levaduras y genes de resistencia a ampicilina (*Amp^r*) y cloranfenicol (*Cm^r*) para la selección en bacterias. Contiene el gen *ccdB* y sitios *attR* para el clonaje de la ORF de *IXR1* mediante el sistema *Gateway*[®] de Invitrogen, y que permite fusionar en pauta con EGFP en su extremo carboxilo terminal.



pDONR221

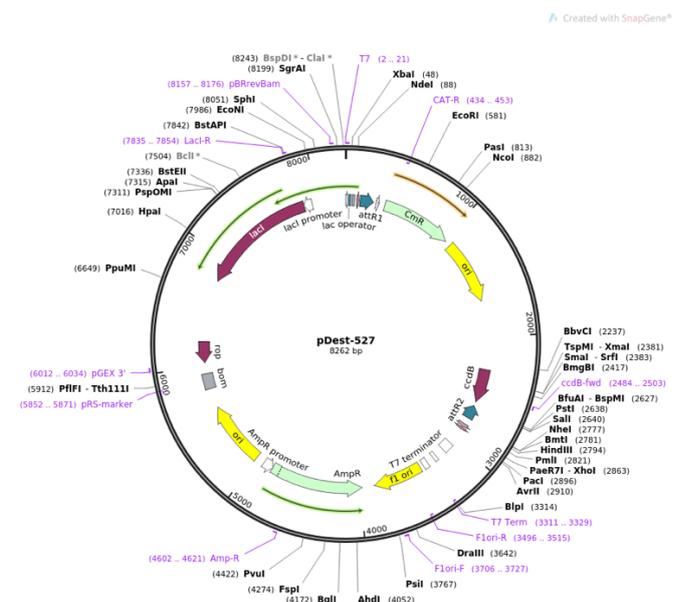
Contiene gen de resistencia a la kanamicina (*Kan^r*) para la selección en bacterias y el gen *ccdB* flanqueado en este caso por sitios *attP* para el clonaje de la ORF de *IXR1* mediante el sistema *Gateway*[®] de Invitrogen de la ORF de *Ixr1* amplificada por PCR.



2.2 Plásmidos de bacterias

pDEST527 (addgene)

Es un plásmido diseñado para la expresión heteróloga de proteínas en *Escherichia coli*. Su expresión está controlada por el promotor de la T7 polimerasa, la cual a su vez se encuentra bajo la regulación del operón *lac* en el genoma de la cepa bacteriana BL21(DE3), activado por lactosa y reprimido por glucosa. Contiene genes de resistencia a ampicilina (*Amp^r*) y cloranfenicol (*Cm^r*). Contiene el gen *ccdB* y sitios *attR* para el clonaje de la ORF de *IXR1* en pauta de lectura con una "etiqueta" o secuencia de 6 histidinas (6xHis) en su extremo amino terminal.



Cebadores	Secuencia	Amplificación
AJVV061f	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCgaaggagataacaaaATG AATCTCAATAACCAAGGACATAGCGAAC	Región N-term (ensayos <i>in vivo</i>)
AJVV062r	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACCTTGTTTCTTCAATT CTTTACGTTTTGCGATAC	
AJVV035f	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCgaaggagataacaaaATG CAGTTTAATCAAAGACAGCAGAATCAACCG	Región IQA (ensayos <i>in vivo</i>)
AJVV036f	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCgaaggagataacaaaATG CAAGCGGCGCAGGCTCAGGCTCAGGC	Región sQA (ensayos <i>in vivo</i>)
AJVV037r	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGACCATAATGCTGT TGCATGGAAGCATG	Regiones IQA y sQA (ensayos <i>in vivo</i>)
AJVV059f	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAATCTCAATAAC CAAGGACATAGCGAAC	Región N-term (ensayos <i>in vitro</i>)
AJVV060r	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAACCTTGTTTCTTCA ATTCTTTACGTTTTGCGATAC	
AJVV032f	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCCAGTTTAATCAAAGA CAGCAGAATCAACCG	Región IQA (ensayos <i>in vitro</i>)
AJVV033f	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCCAAGCGGCGCAGGC TCAGGCTCAGGC	Región sQA (ensayos <i>in vitro</i>)
AJVV034r	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTACTGACCATAATGC TGTTGCATGGAAGCATG	Regiones IQA y sQA (ensayos <i>in vitro</i>)

Tabla 1. Cebadores empleados para las PCR. Se indican el codón de inicio (ATG) en verde, el codón de parada (CTA) en rojo, la secuencia *Kozak* en azul, las secuencias *attB* del sistema *Gateway* en cursiva y las secuencias de hibridación con el molde en negrita.

5. Inserción de las IDRs de estudio de *lxr1* en los plásmidos

Las diferentes IDRs de estudio de *lxr1* amplificadas por PCR, se insertaron en los diferentes plásmidos descritos anteriormente: pAG415, pAG426, pDEST527 y pDEST565 mediante reacciones de clonaje BP y LR (Invitrogen). La reacción de clonaje BP catalizada por la *BP Clonase II* (Invitrogen) facilita la transferencia del producto de PCR flanqueado por sitios *attB* con un vector donante que contiene sitios *attP* para generar una construcción de entrada con el inserto de interés flanqueado por sitios *attL* (**Figura 8**). Para llevarla a cabo, en tubos de PCR de 0,2 mL, se mezclaron 1 µL del producto de PCR correspondiente (75-100 ng/µL), 1 µL de vector pDONR221TM (50 ng/µL) y 0,5 µL de BP Clonase II Master Mix (Invitrogen). Se incubaron a 25 °C durante 3 horas en un bloque térmico *MWG-Biotech Primus 25 Thermal Cycler* (MWG-Biotech). Posteriormente, se procedió a la transformación de células competentes One Shot OmniMAXTM 2-T1^R de *E. coli*, siguiendo el mismo protocolo indicado o recogido en el apartado 8.2 de transformación de bacterias. Para seleccionar las células transformadas con las construcciones de entrada (pDONR221TM), se emplearon placas con medio LB suplementado con Kanamicina (33 µg/mL) y se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

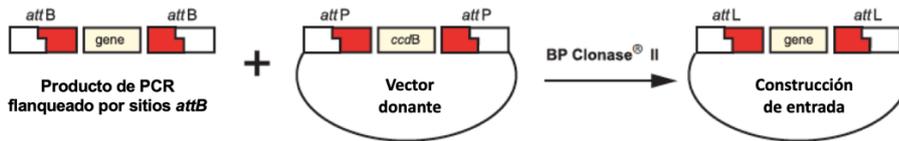
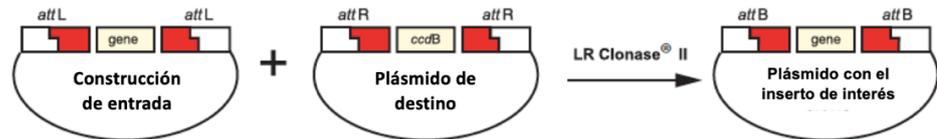


Figura 8. Esquema de la reacción de clonaje BP (Invitrogen, 2012)

Lo siguiente es la generación de las construcciones que utilizaremos en nuestros estudios mediante la reacción de clonaje LR, en la que se transfiere el inserto de interés a un plásmido de destino con sitios *attR*, para dar lugar a un plásmido con el inserto de interés flanqueado por sitios *attB* (Figura 9).

Figura 9. Esquema de la reacción de clonaje LR (Invitrogen, 2012)



Para ello, en tubos de PCR de 0,2 mL, se mezclaron 1 μ L del plásmido pDONR221TM con los correspondientes insertos de interés (50 ng/ μ L), 1 μ L de plásmido de destino (50 ng/ μ L) y 0,5 μ L de LR Clonase II Master Mix (Invitrogen). Se incubaron en un bloque térmico *MWG-Biotech Primus 25 Thermal Cycler* (MWG-Biotech) a 25 °C durante 3 horas. A continuación, se siguió el mismo protocolo de transformación de células competentes de la cepa One Shot[®] OmniMAX[™] 2-T1^R, se sembró en placas con medio LB suplementado con ampicilina (100 μ g/mL) y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. En la Tabla 2, se recogen las construcciones generadas para el presente trabajo.

Tabla 2. Construcciones derivadas de los diferentes plásmidos empleados.

Construcción	Plásmido
pAG415ADH-N-term-SUP35C	amp ^r cam ^r ori 2 μ m ori pBR322 ccdB-site ADH1-promoter Cterm-SUP35C LEU2 lxr1(1-316)
pAG415ADH-IQA-SUP35C	amp ^r cam ^r ori 2 μ m ori pBR322 ccdB-site ADH1-promoter Cterm-SUP35C LEU2 lxr1(141-199)
pAG415ADH-sQA-SUP35C	amp ^r cam ^r ori 2 μ m ori pBR322 ccdB-site ADH1-promoter Cterm-SUP35C LEU2 lxr1(161-199)
pAG426GAL-N-term-EGFP	amp ^r cam ^r ori 2 μ m ori pBR322 ccdB-site GAL1-promoter Cterm-EGFP URA3 N-term lxr1(1-316)
pAG426GAL-IQA-EGFP	amp ^r cam ^r ori 2 μ m ori pBR322 ccdB-site GAL1-promoter Cterm-EGFP URA3 IQA lxr1(141-199)
pAG426GAL-sQA-EGFP	amp ^r cam ^r ori 2 μ m ori pBR322 ccdB-site GAL1-promoter Cterm-EGFP URA3 sQA lxr1(161-199)
pAG426GAL-PrD2-EGFP	amp ^r cam ^r ori 2 μ m ori pBR322 ccdB-site GAL1-promoter Cterm-EGFP URA3 lxr1(1-336)
pAG426GAL-PrD3-EGFP	amp ^r cam ^r ori 2 μ m ori pBR322 ccdB-site GAL1-promoter Cterm-EGFP URA3 lxr1(1-200)
pDEST527-N-term	amp ^r cam ^r ori lacI-promoter 6xHis-lxr1(1-316)
pDEST527-IQA	amp ^r cam ^r ori lacI-promoter 6xHis-lxr1(141-199)
pDEST527-sQA	amp ^r cam ^r ori lacI-promoter 6xHis-lxr1(161-199)
pDEST565-N-term	amp ^r cam ^r ori lacI-promoter 6xHis-GST-lxr1(1-316)
pDEST565-IQA	amp ^r cam ^r ori lacI-promoter 6xHis-GST-lxr1(141-199)
pDEST565-sQA	amp ^r cam ^r ori lacI-promoter 6xHis-GST-lxr1(161-199)

6. Obtención de ADN plasmídico

Se llevó a cabo con el kit comercial *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Fisher Scientific). En primer lugar, se tomó con un palillo masa de células OmniMAX One Shot 2-T1[®] sembradas en placas Petri e incubadas a 37 °C durante 24 horas, se resuspendieron en 250 µL de solución de resuspensión, *Resuspension Solution*, y se homogeneizó con un vórtex. Se añadieron 250 µL de tampón de lisis, *Lysis Buffer*, y se mezcló por inversión. Se añadieron 350 µL de la solución de neutralización, *Neutralization Solution*, y se mezcló por inversión. A continuación, se centrifugó en la centrífuga *Heraeus Biofuge pico* (Heraeus) a 13.000 rpm durante 5 minutos y se pasó el sobrenadante a unas columnas. De nuevo, se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto y se descartó el eluido del tubo colector. Se añadieron 500 µL de solución de lavado, *Wash Solution*. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto y se descartó el eluido del tubo colector. Se añadieron 500 µL de solución de lavado, *Wash Solution*. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto y se descartó el eluido del tubo colector. Posteriormente, se centrifugó a 13.000 rpm durante 2 minutos para retirar los restos de la solución de lavado. Tras esto, se acoplaron las columnas a nuevos tubos *Eppendorf* de 1,5 mL, los cuales se mantuvieron abiertos durante 2 minutos para que evaporasen los restos de etanol. Finalmente, se añadieron 40 µL de tampón de elución, *Elution Buffer*, a la membrana del interior de las columnas y se centrifugaron los *Eppendorf* con las columnas acopladas a 13.000 rpm durante 2 minutos. Se conservaron a - 20 °C.

7. Cuantificación del ADN plasmídico

Tras la extracción de ADN plasmídico, se cuantificaron las muestras en un espectrofotómetro *Eppendorf BioPhotometer[®] D30* (Eppendorf). Para ello, se añadieron 3 µL de cada muestra en una cubeta de metacrilato *Eppendorf µCuvette[®] G1.0* (Eppendorf), se midió la absorbancia a 260 nm (A260) y 280 nm (A280) para obtener la relación de absorbancias A260/280. La aproximación de esta relación a un valor superior a 1,8 significa que la pureza de la muestra es adecuada (Glasel, 1995).

8. Transformaciones

8.1 Levaduras

Una colonia aislada de cada cepa, YJW509 e YJW584, incubadas a 30 °C durante 48 horas en placas con medio YPD, se inoculó en 70 mL de YPD líquido y se incubó a 30 °C, con agitación de 200 rpm durante 24 horas. Se midió la OD₆₀₀ y se iniciaron nuevos cultivos a la mañana para que se encontrasen en fase logarítmica en el momento de emplearlos. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron 10 mL de cultivo durante 5 minutos a 5.000 rpm en la centrífuga *Nahita Centrifuge Model 2690* (Nahita[®]). Se retiró el medio de cultivo y las células se resuspendieron en 1 mL de una solución con acetato de litio 0.9 M y TE 1X (Tris HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM). Por decantación, se transfirió el contenido a tubos *Eppendorf* de 1,5 mL estériles. Se centrifugaron durante 5 minutos a 5.000 rpm. Posteriormente, se retiró la solución y se añadieron 700 µL de otra solución con PEG3350 al 5%, TE 1X, acetato de litio 0,9 M y 5 µL de ADN de salmón a una concentración de 10 mg/mL. Se añadieron 2 µg de las construcciones obtenidas del plásmido pAG426GAL-ccdB-EGFP para cada transformación. Se incubaron a 30 °C durante 30 minutos y con agitación de 300

rpm. Tras este paso, se añadieron 88 μ L de *Dymethyl sulfoxide Reagent Plus*[®] (Sigma Aldrich) y se sometieron a choque térmico a 42 °C durante 7 minutos en el bloque térmico *Eppendorf ThermoMixer*[®] C (Eppendorf). Se centrifugaron durante 5 minutos a 5.000 rpm, se descartó el sobrenadante, para a continuación resuspenderlas en 1 mL de YPD. Se incubaron a 30 °C durante 2 horas con agitación de 300 rpm para que tuviese lugar la recuperación celular. Finalmente, se sembraron las células en placas con medio selectivo CM-URA. Las placas se incubaron durante 48 horas a 30 °C.

8.2 Bacterias

Bajo condiciones de esterilidad, se incubaron 100 μ L de las células competentes de BL21(DE3) con 4 μ L de las correspondientes construcciones obtenidas de los plásmidos pDEST527 y pDEST565, en hielo, durante 30 minutos en tubos Eppendorf de 1,5 mL. Una vez transcurrido este tiempo, se sometieron a un choque térmico a 42 °C durante 45 segundos y, de nuevo, se incubaron en hielo durante 2 minutos. A continuación, se añadió 1 mL de medio LB líquido y se incubó durante 1 hora en agitación a 37 °C para que tuviese lugar la recuperación de las células. Se centrifugó a 3.500 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Finalmente, las células se resuspendieron en 150 μ L de medio LB y se sembraron en placas selectivas con medio LB suplementado con ampicilina para su posterior incubación a 37 °C durante 24 horas.

9. Estudio de la formación de amiloides *in vitro*

9.1 Ensayos de expresión heteróloga en bacterias y comprobación mediante Dot-Blot

Se inocularon 20 mL de medio LB (Luria-Bertani) en matraces Erlenmeyer de 100 mL con colonias aisladas de la cepa BL21(DE3) transformada con las construcciones derivadas de los plásmidos pDEST527 y pDEST565, se incubaron a 37 °C con agitación de 250 rpm hasta que alcanzaron una OD₆₀₀ de 0,8, para a continuación inducir la expresión mediante la adición IPTG 1mM. Se dejó expresando durante 3 horas, de nuevo, a 37 °C con agitación de 250 rpm. Posteriormente, se transfirió 1 mL a tubos Eppendorf de 1,5 mL para la realización del Dot-Blot, se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto, se retiró el sobrenadante y se conservaron los pellets celulares a -80 °C.

Los pellets celulares se resuspendieron en 500 μ L de una mezcla de lisis (tampón de lisis *NZY Bacterial Cell Lysis Buffer* (NZYTech), DNAsa (2 mg/mL), lizozima (50 mg/mL)) y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y agitación por inversión. Tras separar fases por centrifugación a 13.000 rpm durante 5 minutos, se aplicaron directamente 5 μ L del sobrenadante a una membrana de nitrocelulosa Protran[®] (Whatman), que se incubó a 37 °C durante 5 minutos para eliminar el exceso de humedad, y a continuación se bloqueó en tampón PBST (Tris HCl 1M pH 8, NaCl 4.8 M y Tween-20 0.1%) con BSA 5%; manteniéndose en agitación orbital durante 30 minutos y temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana se incubó con una dilución 1:10000 de un anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce la etiqueta 6xHis y que está conjugado con peroxidasa de rábano HRP (HRP-66005, ProteinTech) en tampón PBST con BSA 5%, a 37 °C durante 1 hora en agitación orbital. Se realizaron tres lavados de la membrana en tampón PBST, de 5 minutos cada uno, en agitación orbital. Por último, se reveló la membrana mediante

una reacción colorimétrica, empleando una solución de revelado (Tris HCl 50 mM pH 7.6, DAB 2 mM, NiCl₂ 7 mM y H₂O₂ 0.2% v/v). La captura de las imágenes mostradas se obtuvo mediante digitalización con el equipo Molecular Imager® Gel Doc XR y el software Image Lab™ (BioRad).

9.2 Purificación de las IDRs clonadas de *lxr1* por cromatografía de afinidad

Las diferentes IDRs de *lxr1* producidas a partir de las construcciones del plásmido pDEST527, que portan una cola de 6 histidinas consecutivas en el extremo amino terminal, fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad por unión a una resina de níquel *HisPur™ Ni-NTA resin* (Thermo Scientific) empaquetada en columnas *Econo-Pac Chromatography columns* (BioRad). La purificación se realizó en condiciones desnaturizantes, puesto que las IDRs no presentan un plegamiento definido que requiera la preservación de su estado nativo. Para ello, se resuspendieron los pellet celulares conservados a -80 °C (provenientes de cultivos celulares de 1 L en matraces Erlenmeyer de 2 L) en tampón de lisis (hidrocloruro de guanidina 7 M, K₂HPO₄ 100 mM pH 8, imidazol 5 mM, NaCl 300 mM, β-mercaptoetanol 5mM) y se mantuvieron en agitación circular constante, durante 1 hora y a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugaron en una centrífuga *Centrifuge 5804/5804R* (Eppendorf) a 14.000 rpm durante 30 minutos y los sobrenadantes se cargaron en las columnas, previamente equilibradas con el mismo tampón de lisis. Tras esto, se lavaron las columnas con 10 CV (volúmenes de columna) del mismo tampón. A continuación, se eluyeron las proteínas de interés con 2 mL de tampón de elución (urea 8 M, NaOAc/HOAc 100 mM pH 4, β-mercaptoetanol 5 mM), se precipitaron mediante metanol-cloroformo y se resuspendieron en 100 µL de tampón de resuspensión (hidrocloruro de guanidina 7 M, K₂HPO₄ 100 mM pH 5, NaCl 300 mM, EDTA 5 mM, TCEP 5 mM). Se determinaron las concentraciones de proteína mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), midiendo la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro *Eppendorf BioPhotometer® D30* (Eppendorf) y extrapolando los valores en una recta patrón realizada con BSA. Por último, las muestras se conservaron a 4 °C hasta el momento de su uso.

9.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante: SDS PAGE

Para comprobar si el proceso de purificación de las diferentes IDRs de *lxr1* ha tenido lugar adecuadamente, se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE) en un sistema *Mini PROTEAN 3 Cell* (BioRad), con un marcador de pesos moleculares como referencia. Para ello, se preparó un gel separador con 10% de acrilamida, que separa las muestras en función de su tamaño molecular, y un gel concentrador con 5% de acrilamida, que concentra las muestras en un único frente de migración. En tubos Eppendorf de 1,5 mL, se diluyeron las muestras en tampón de carga 4X (Tris HCl pH 6.8 0.12 M, SDS 6%, glicerol 10%, 2-mercaptoetanol 15%, azul de bromofenol 0.0025%) y se incubaron a 100 °C durante 10 minutos para la desnaturización de las proteínas. Transcurrido este tiempo, se procedió a realizar la electroforesis en tampón de electroforesis (Tris HCl pH 8.3 0.02 M, Glicina 0.2 M, SDS 0.003 M) manteniendo un voltaje constante de 150 V hasta que el frente alcanzó el final del gel. Una vez concluida la electroforesis, los geles se tiñeron con azul de Coomassie (BioRad) en acético 10% durante 10 minutos en agitación orbital. Posteriormente, se realizaron lavados con una solución de acético 10% para eliminar el exceso de colorante. La captura de las imágenes mostradas se

obtuvo mediante digitalización con el equipo Molecular Imager® Gel Doc XR y el software Image Lab™ (BioRad).

9.4 Ensayo fluorimétrico de la formación de amiloides *in vitro*

Se investigó la capacidad de las diferentes IDR de estudio de la proteína Ixr1 de *K. lactis* para formar amiloides mediante un ensayo basado en la fluorescencia emitida por la Tioflavina T (ThT). Se calentaron las soluciones de las IDR de Ixr1 purificadas y resuspendidas en tampón de resuspensión (hidrocloruro de guanidina 7 M, K₂HPO₄ 100 mM pH 5, NaCl 300 mM, EDTA 5 mM, TCEP 5 mM) a 95 °C durante 5 minutos en bloque térmico, para una completa desnaturalización de las mismas y favorecer así el proceso de formación de estructuras amiloides y posterior unión de ThT. A continuación, se mezcló cada proteína (concentración final de 20 µM) con una solución de ThT (concentración final de 20 µM) en un volumen final de 125 µL con tampón reconstituyente (K₂HPO₄ 5 mM pH 6.6, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, TCEP 2 mM) en una placa de 96 pocillos opacas con fondo transparente (Corning) para medir la intensidad de fluorescencia de las muestras, con una longitud de onda de excitación de 450 nm y de emisión de 480 nm durante 16 horas, empleando un lector de placas *Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader* (BioTek) (Vizoso-Vázquez, 2015).

10. Estudio de la formación de amiloides *in vivo*

10.1 Visualización de amiloides en microscopio de fluorescencia

Para visualizar la posible formación de amiloides *in vivo* de las diferentes IDR de estudio de la proteína Ixr1, se hicieron inóculos de las cepas YJW509 e YJW584 transformadas con las construcciones del plásmido pAG426GAL-ccdB-EGFP, que contienen las diferentes IDR de estudio de la proteína Ixr1 fusionadas a EGFP, en matraces Erlenmeyer con medio de cultivo CM-URA suplementado con glucosa (control negativo) o galactosa. Se incubaron a 30 °C, en agitación a 250 rpm durante 72 horas. Se observaron las muestras en un microscopio de fluorescencia *Nikon Eclipse 50i* (Nikon®) (filtro GFPHQ, EX: 455-485; DM: 495; BA: 500-545) tras 24, 48 y 72 horas de crecimiento. Se tomaron imágenes con una cámara digital *Sight DS-5M* (Nikon®) y se procesaron con el software *NIS-Elements D v2.20* (Nikon®). Como control positivo de formación de amiloides *in vivo*, se emplearon las construcciones pAG426GAL-PrD2-EGFP y pAG426GAL-PrD3-EGFP, que contienen las regiones PrD2 y PrD3 de la proteína Ixr1 de *S. cerevisiae* fusionadas a EGFP (Vizoso-Vázquez, 2015).

10.2 Extracción de proteínas solubles totales

Se resuspendieron los pellets celulares de las cepas YJW509 e YJW584 transformadas con las diferentes construcciones del plásmido pAG426GAL-ccdB-EGFP, en 400 µl de tampón de lisis (Tris HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 250 mM, EDTA 5mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, Benzamidina 1 mM y Pepstatina 5 µM) y se llevó a cabo la lisis celular empleando perlas de vidrio mediante agitación en *vortex* durante 20 segundos, seguido de pausas breves en hielo (7 ciclos). Posteriormente, se centrifugaron a 14.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C, tras lo cual, se transfirió el sobrenadante a tubos Eppendorf de 1,5 mL, que se conservaron a -80 °C.

10.3 Cuantificación de proteínas solubles totales

Se cuantificó la concentración de proteínas totales empleando el método de Bradford (Bradford, 1976), con el fin de asegurarnos que la cantidad de muestra cargada en todos los carriles del gel de poliacrilamida sea lo más similar posible. Para ello, previamente, se hizo una recta patrón con BSA (0, 1, 3, 5, 10 y 15 mg/mL). Se preparó una dilución 1/40 de las muestras y posteriormente se añadieron 200 μ L de reactivo de Bradford (BioRad) tanto a estas como a las de BSA y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, se leyó la absorbancia a 595 nm en el lector *Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader* (BioTek), se construyó la recta patrón hecha con BSA y se extrapolaron los valores de absorbancia de las muestras a través de dicha recta para obtener los valores de concentración.

10.4 Western Blot

Partiendo de los lisados celulares de las cepas YJW509 e YJ584, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa semidesnaturalizante (SDD-AGE). Se ajustaron las concentraciones de los lisados y se incubaron en tampón de muestra 4X (TAE 2X, glicerol 20%, SDS 4%, azul de bromofenol) a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente se cargaron en un gel de agarosa al 1.8%, en tampón TAE 1X que contiene SDS al 0.1%, sometiénndose a un voltaje de 50 V durante el tiempo necesario hasta completar la electroforesis. Una vez completada, el gel se transfirió a una membrana de fluoruro de polivinilideno, PVDF, previamente humedecida en metanol y tampón de transferencia (Tris-Base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%) durante 30 segundos. Posteriormente, se realizó la transferencia con un voltaje constante de 300 mA durante 1 hora en el sistema *Mini Trans-Blot Cell* (BioRad). A continuación, se bloqueó la membrana en tampón TBST 1X (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0.2%) con BSA al 5%, en agitación, durante 1 hora y a temperatura ambiente, para posteriormente incubarse en una dilución del anticuerpo primario IgG de ratón anti-eGFP (MA1I952 – Thermo Fisher Scientific), de nuevo en BSA al 5% en TBST 1X, en agitación, durante 1 hora y media y a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se lavó la membrana tres veces con TBST 1X durante 10 minutos y se incubó en una dilución 1:5000 del anticuerpo secundario IgG-HRP de cabra anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (sc-2005 – Santa Cruz Biotechnology) en BSA al 5% en TBST 1X, a temperatura ambiente durante 1 hora. Finalmente, se lavó la membrana tres veces con TBST 1X durante 10 minutos y se reveló con el sustrato quimio-luminiscente *Pierce ECL Plus* (Thermo Fisher Scientific). La captura de las imágenes mostradas se obtuvo mediante digitalización con el equipo Molecular Imager® Gel Doc XR y el software Image Lab™ (BioRad).

11. Herramientas bioinformáticas

A partir de la secuencia de *lrx1* de *K. lactis* obtenida en la base de datos NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), se empleó el programa PSIPRED 4.0 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>) para la predicción de la estructura secundaria y presencia de regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs) y el programa IUPred 2 (<https://iupred2a.elte.hu>) para complementar la predicción de regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs) realizada con PSIPRED 4.0.