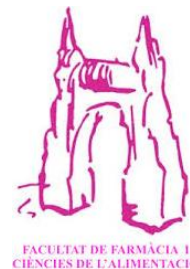




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Facultat de Farmàcia
i Ciències de l'Alimentació



Treball Final de Grau

Grau de Farmàcia

Model priònic de *S. Cerevisiae* per a l'estudi de l'agregació proteica en malalties amiloides

David Patiño Menéndez

Fisicoquímica i tècniques instrumentals

Química Farmacèutica i Microbiologia

Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Fisicoquímica

Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació

Universitat de Barcelona

Barcelona, 01 de juliol de 2025





Aquesta obra està subjecta a una llicència [Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Vull agrair al meu pare, Jesús, per ser el millor referent que un fill pot tenir; al meu germà, Víctor, per ajudar-me a ser la meva millor versió i poder ser el seu referent; als meus avis, per voler sempre la meva felicitat per sobre de qualsevol cosa; a la meva parella, Adela, per estar sempre al meu costat i ser el meu pilar durant aquests 5 anys.

I a la meva mare, Natàlia, que desitjo que, allà on sigui, estigui orgullosa de mi.

Resum:

Model prònic de *S. Cerevisiae* per a l'estudi de l'agregació proteica en malalties amiloides

Les malalties amiloides tal com l'Alzheimer actualment suposen un gran problema sanitari. La falta de fàrmacs eficaços genera la necessitat urgent de noves estratègies terapèutiques. L'objectiu principal del treball ha estat utilitzar la proteïna prònica Sup35p de *Saccharomyces cerevisiae* com a una eina per identificar el potencial inhibidor de l'agregació amiloide de diferents compostos. Aquest model es basa en com la proteïna Sup35p pot adoptar diferents fenotips, [psi⁻] i [PSI⁺], en funció de si es troba en la forma soluble o agregada, respectivament. A més, s'ha utilitzat una sòca modificada per expressar el pèptid amiloide Aβ42. Per diferenciar les soques i comprovar si s'ha produït la reversió del fenotip, s'han fet servir mètodes visuals i de creixement en medis selectius. Els resultats han mostrat com es poden distingir clarament les soques mitjançant aquests mètodes, així com la reversió eficaç del fenotip per part de la guanidina, un compost conegut per la seva activitat antiprònica. No obstant això, els compostos analitzats amb activitat antiamiloides prèviament descrita (DP128, quercetina i apigenina) no han mostrat la capacitat de revertir el fenotip prònic en aquest sistema. Tot i això, el sistema proposat representa una eina prometedora per la recerca de nous fàrmacs contra les malalties amiloides, oferint un cribratge inicial senzill, econòmic i ràpid per compostos amb potencial inhibitori de l'agregació. Per tant, se suggereix la necessitat de continuar amb l'optimització del mètode, així com d'ampliar l'estudi i ajustar les condicions experimentals per tal de validar-ne plenament la seva utilitat.

Paraules clau: Sup35p, antiamiloides, [PSI⁺], Aβ42

Abstract:

Prion model of *S. cerevisiae* for the study of protein aggregation in amyloid diseases

Amyloid diseases, such as Alzheimer's, currently represent a major health challenge. The lack of effective drugs highlights the need to develop new therapies and promote the search for compounds that can modify disease progression. The main objective of this work was to use the prion protein Sup35p in *Saccharomyces cerevisiae* as a tool to identify the potential inhibitory activity against amyloid aggregation of different compounds. This model is based on how the Sup35p protein can adopt different phenotypes, [psi⁻] and [PSI⁺], depending on whether it is in a soluble or aggregated form. Additionally, a modified strain expressing the amyloid peptide Aβ42 was used. Visual methods and growth in selective media were applied to differentiate the strains and assess whether phenotypic reversion occurred. The results showed that the strains can be clearly distinguished using these methods, and showed that guanidine, a compound known for its antiprion activity, was able to effectively revert the phenotype. However, the compounds previously described as having anti-amyloid activity (DP128, quercetin, and apigenin) did not show the ability to revert the prion phenotype in this system. Despite this, the proposed system represents a promising tool in the search for new drugs against amyloid diseases, offering a simple, low-cost, and rapid initial screening method for compounds with potential anti-aggregation effects. Therefore, further optimization of the method is suggested, as well as expanding the study and refining experimental conditions to fully validate its applicability.

Keywords: Sup35p, Anti-amyloid, [PSI⁺], Aβ42

Integració d'àmbits

Aquest TFG integra diversos àmbits de coneixement que s'han anat treballant al llarg del grau i que s'apliquen de manera pràctica en el desenvolupament del projecte.

L'àmbit principal del treball és **Fisicoquímica i Tècniques Instrumentals**. S'utilitzen mètodes com l'espectrofotometria UV-Vis i la fluorescència. El correcte ús d'aquestes tècniques per avaluar els compostos usats sobre les soques de llevat són exemples clars de com s'apliquen els coneixements de l'àmbit de Fisicoquímica en un context real.

El treball també se situa en l'àmbit de **Química Farmacèutica**, ja que es fa una anàlisi funcional de diferents molècules bioactives, com la quercetina, l'apigenina i el compost DP128, amb l'objectiu d'avaluar la seva capacitat d'inhibir l'agregació proteica en els llevats. Per tant, el treball es connecta amb la recerca de fàrmacs i obre la porta a noves possibles aplicacions terapèutiques per les malalties amiloides com l'Alzheimer.

Finalment, el TFG té una base important de l'àmbit de **Microbiologia**. S'utilitza el llevat *Saccharomyces cerevisiae* com a sistema model. En conseqüència, els coneixements sobre cultiu, manteniment, creixement i manipulació de llevats són essencials per dur a terme els experiments correctament.

Objectius de Desenvolupament Sostenible (ODS)

Aquest projecte s'ubica a la ciència biomèdica, buscant fer servir llevats (*Saccharomyces cerevisiae*) per buscar substàncies contra l'agregació amiloide. Es pensa que aquest mètode seria de gran utilitat en el primer cribatge per trobar futurs fàrmacs. És un model econòmic i ràpid, que podria ajudar molt en les fases inicials de la recerca. Malalties causades per l'acumulació de proteïnes malplegades, com ara l'Alzheimer, el Parkinson o la malaltia de Huntington, estan augmentant molt en els últims anys. A mesura que la població envelleix, cada cop es veuen més casos, i això té un impacte molt gran, no només per a la persona afectada, sinó també per a les famílies i per al sistema de salut en general. Són malalties complexes, amb pocs tractaments realment eficaços, i això fa que la recerca sigui més urgent que mai. Davant d'això, és clar que cal cercar mètodes que ajudin a trobar possibles fàrmacs. El model d'aquest projecte permet una selecció inicial més ràpida i barata que ajuda a accelerar la cerca i la troballa de fàrmacs.

Amb tot el que s'ha explicat, es considera que els ODS tractats en aquest TFG comprenen diversos àmbits: les **persones**, la **prosperitat** i el **planeta**.

Dins de l'àmbit de les persones, es destaca l'**ODS 3** "Salut i benestar", sobretot el 3b "reforçar les activitats d'investigació i desenvolupament contra les malalties transmissibles i no transmissibles", on entra el nostre projecte. Tot i això, no hi ha un indicador que mostri com el nostre projecte podria ajudar a millorar la qualitat de vida de les persones amb els fàrmacs que utilitzin aquest cribratge inicial. Dins de l'àmbit de la prosperitat, trobem l'**ODS 9** "Indústria, innovació i infraestructura". Concretament, l'objectiu 9.5 "Augmentar la investigació científica i millorar la capacitat tecnològica en els sectors industrials". L'aplicació d'aquest model pot tenir un impacte futur important en la indústria biomèdica, afavorint el desenvolupament preclínic de nous tractaments. Finalment, en l'àmbit de planeta, trobem l'**ODS 12** "Producció i consum responsables" i més específicament la meta 12.2 "Ús eficient i sostenible dels recursos naturals". El fet d'obtenir un mètode que permet realitzar un primer cribratge en cèl·lules de llevat fa que el nombre de fàrmacs a provar posteriorment en animals es redueixi. Per aquest motiu, el projecte contribueix també a una ciència més ètica que s'alinea amb l'ODS mencionat.

Índex

Introducció	1
El plegament proteic	1
Amiloides i malalties neurodegeneratives	3
Prions	4
Sup35 i [PSI ⁺]	5
Objectius	9
Material i mètodes	10
Soques de llevat	10
Medis de cultiu.....	10
Detecció d'agregats priònics mitjançant la determinació de l'absorbància i la fluorescència	11
Lisi cèl·lules	12
Guanidina.....	12
Compostos antiamiloides.....	12
Resultats i discussió	14
Diferenciació de soques	14
Canvi de fenotip mitjançant incubació en GdnHCl	15
Diferenciació mitjançant fluorescència.....	18
Compostos Antiamiloides	20
Conclusions	23
Bibliografia	24

Introducció

El plegament proteic

Les proteïnes són macromolècules essencials per a pràcticament tots els processos biològics cel·lulars.(1) Actuen en el transport molecular, la transducció de senyals, el manteniment estructural de les cèl·lules i en la catàlisi de reaccions químiques, entre d'altres.(2)

Per tal de dur a terme totes aquestes funcions biològiques, les proteïnes han d'adquirir una estructura tridimensional molt concreta anomenada estat natiu. El procés mitjançant el qual assoleixen aquest estat es coneix com a plegament proteic. Les proteïnes són sintetitzades als ribosomes, que formen una primera cadena lineal d'aminoàcids coneguda com a estructura primària. Aquesta seqüència aminoacídica determinarà la seva **conformació tridimensional**, la qual és específica de cada proteïna i es considera un estat termodinàmicament estable.(1–3)

Tradicionalment, el plegament proteic es considerava com un procés espontani, on la conformació que adopta una proteïna és la de menor energia. Aquest principi, de base termodinàmica, es coneix com el dogma d'Anfisem.(4) Tot i així, l'entorn intracel·lular real, no és tant ideal. El citoplasma cel·lular és un entorn altament poblat que pot influir significativament en aquest procés, afavorint o dificultant l'adquisició de l'estructura correcta, i en alguns casos, conduint a errors de plegament.(1–3)

Per evitar aquests errors i garantir que les proteïnes assoleixin la seva conformació funcional, les cèl·lules compten amb l'ajuda de molècules especialitzades anomenades **xaperones moleculars**.(1,2) Aquestes molècules tenen un paper clau en l'assistència al plegament correcte de les proteïnes i en la prevenció de la formació d'agregats no funcionals. L'acció coordinada de diferents tipus de xaperones, actives tant durant com després de la síntesi proteica, contribueix a mantenir la qualitat del proteoma cel·lular.(1–3)

Diversos factors poden interferir en el correcte plegament de les proteïnes. Mutacions genètiques que afectin la seqüència d'aminoàcids, canvis en l'entorn cel·lular o la presència de factors externs, com l'estrès oxidatiu o alteracions de pH, poden fer que

certes proteïnes es tornin inestables. Quan tot això passa, poden quedar exposades **regions hidrofòbiques**, generalment amagades a l'interior de les estructures natives. Aquestes regions hidrofòbiques tenen tendència a unir-se entre elles o amb altres proteïnes també mal plegades, donant lloc a la formació d'agregats proteics. Les xaperones esmentades reconeixen i s'uneixen a aquests residus, evitant l'exposició de les regions i, per tant, l'agregació.(1–3,5,6)

Per entendre millor aquest procés, sovint es fa servir la metàfora del **paisatge energètic del plegament proteic**.(7) Imaginem aquest paisatge energètic com un terreny rugós, on podem visualitzar l'espai conformacional d'una cadena polipeptídica, d'una proteïna, on hi veiem representats diferents mínims energètics (**Figura 1**). Un d'aquests punts més baixos correspon a la conformació nativa. Però aquest camí no sempre és fàcil ni directe, altres mínims energètics presents poden donar lloc a la formació d'intermediaris on la proteïna pot quedar atrapada.(1,2,7)

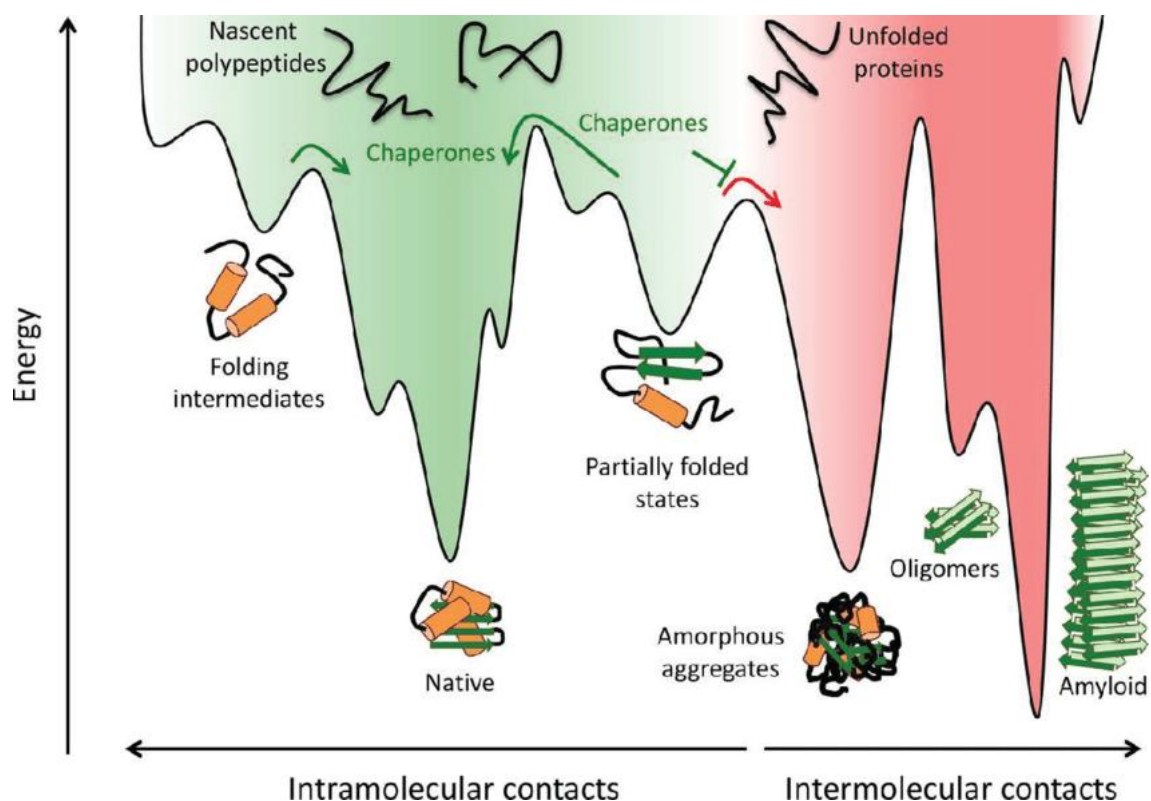


Figura 1. Mapa energètic on hi ha representat l'espai conformacional d'una proteïna. De color verd tenim aquelles conformacions degudes a interaccions intramoleculars i de color vermell les estructures obtingudes a partir d'interaccions intermoleculars. Adaptat de: The free energy landscape during protein folding and aggregation.(8)

Tot i els mecanismes i l'energia que la cèl·lula destina a que aquest procés de plegament tingui èxit, hi ha vegades que es cometen errors. Aquests errors poden donar lloc a camins alternatius del plegament (**Figura 1**), els quals poden ser temporals o irreversibles, i acabar generant **agregats proteics** que poden ser patològics.(1–4,7)

Els agregats proteics poden presentar diferents formes i característiques, i el tipus d'agregat que es forma depèn de les condicions específiques de l'entorn cel·lular o de les característiques intrínseques de les proteïnes.(9–11)

Un dels primers estadis d'aquest procés són els **oligòmers solubles**, que són espècies petites, relativament flexibles i amb forma d'esfera.(12) Són inestables i poden ser molt perjudicials per a les cèl·lules.(13) En processos d'agregació més avançats, es poden formar les **fibril·les amiloides**. Aquestes són estructures altament ordenades que es caracteritzen per un nucli comú format per fulles β orientades perpendicularment a l'eix de la fibra. Paral·lelament, trobem els **agregats amorfs**, sense estructura definida i que se solen formar ràpidament com a resposta a condicions extremes.(12–15)

Amiloides i malalties neurodegeneratives

Les **estructures amiloides** es caracteritzen per una elevada densitat i un alt grau d'ordre estructural, similar al que trobem en les proteïnes globulars ben plegades. No obstant això, els estats amiloides es diferencien notablement en la seva estructura. Les estructures globulars presenten una gran varietat de plegaments, sovint amb dominis estructurals rics en hèlix α i làmines β , mantenint l'estabilitat mitjançant interaccions intramoleculares. En canvi, les estructures amiloides es basen en una xarxa extensa de làmines β paral·leles i antiparal·leles, estabilitzades per ponts d'hidrogen entre diferents cadenes polipeptídiques, amb interaccions majoritàriament intermoleculares, que segueixen l'eix de la fibra.(11)

L'acumulació de proteïnes mal plegades i la seva agregació han estat objecte d'estudi intens durant els darrers anys a causa de la seva relació amb diverses patologies conegudes com a **malalties conformacionals**. Dins d'aquest grup s'hi troben nombroses malalties neurodegeneratives, com l'Alzheimer, el Parkinson o la malaltia de Huntington, en les quals les estructures amiloides tenen un paper clau. En aquests casos, les proteïnes mal plegades poden ser determinants en la disfunció cel·lular i la

neurodegeneració en humans. Tot i que sovint s'observa l'acumulació de fibres amiloides com a formes finals d'agregació, els estudis recents indiquen que la màxima toxicitat prové de formes intermèdies solubles, com els oligòmers.(10,13,15)

Prions

El concepte prió va ser introduït l'any 1982 pel Premi Nobel Stanley B. Prusiner quan va observar que l'agent infecciós que produïa la malaltia de "scrapie" en ovelles i cabres era una proteïna.(16)

Els prions són proteïnes naturals que poden patir un canvi de conformació i plegar-se en una estructura amiloide rica en làmines β , iniciant així una cascada d'auto-propagació en què altres còpies de la mateixa proteïna adquireixen la mateixa conformació.(17,18)

Els prions són, fins avui, l'únic patògen infecciós conegut que no conté àcid nucleic.(19) Les malalties associades a aquests agents poden tenir origen esporàdic, genètic o infecciós, i es classifiquen dins del grup de les encefalopaties espongiformes transmissibles.(17,19,20)

En mamífers, el prió més estudiat és la **proteïna priònica (PrP)**. Aquesta proteïna, en condicions normals (PrP^C), és rica en hèlix α i amb un baix contingut de làmines β . El plegament incorrecte d'aquesta proteïna dona lloc a la formació de la **conformació patogènica (PrP^{Sc})**, caracteritzada per una estructura rica en làmines β i una conformació amiloide estable.(17–20)

Tot i que les dues formes tenen una seqüència d'aminoàcids idèntica, les seves estructures tridimensionals difereixen profundament. Aquesta diferència estructural és la clau del comportament patogènic de PrP^{Sc} , ja que és capaç d'induir el mal plegament de la PrP^C , iniciant una cascada d'auto-propagació conformacional. Aquestes formes amiloides patogèniques causen malalties com Creutzfeldt-Jakob (ECJ) en humans o la malaltia de les vaques boges (EEB) en bovins.(17,19,20)

Una característica distintiva dels prions és la seva capacitat per existir en múltiples conformacions estructurals estables, anomenades **soques priòniques**.(17,18,20) Cada soca presenta propietats bioquímiques específiques, motiu pel qual les manifestacions

clínicas i els patrons de patologia són diferents en cada una de les malalties priòniques.(19,20)

No només trobem prions en mamífers, en organismes unicel·lulars més senzills, com els llevats, també existeixen. Els prions dels llevats són proteïnes que poden actuar com a elements epigenètics, és a dir, poden transmetre característiques fenotípiques hereditàries sense alterar la seqüència d'ADN.(17,18)

Entre els prions més estudiats en fongs trobem els de *Saccharomyces cerevisiae* [URE3] i [PSI⁺], que corresponen a formes auto-propagables de les proteïnes Ure2p i Sup35p, respectivament.(17,18)

Sup35 i [PSI⁺]

La proteïna Sup35 és una subunitat del factor de terminació de la traducció en *Saccharomyces cerevisiae* i, per tant, participa en el reconeixement dels codons STOP durant la síntesi proteica. Aquesta proteïna està formada per tres dominis (**Figura 2**): El domini N-terminal (N), és el domini formador de prions, ric en residus de glutamina (Q) i asparagina (N); el domini M, format principalment per residus carregats, és essencial per a la propagació del prió; i el domini C-terminal (C) que dona lloc a la funció essencial de Sup35p, reconèixer els codons de parada durant la síntesi proteica.(21–23)

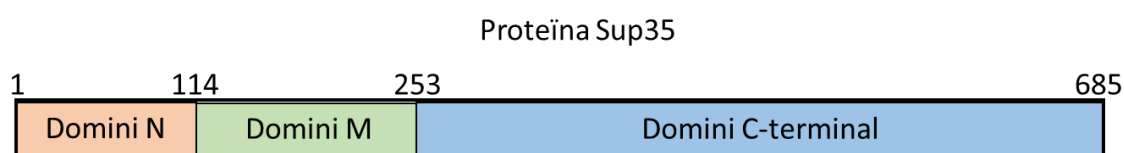


Figura 2. Organització dels dominis de Sup35p. Els números corresponen a les posicions dels aminoàcids.

En condicions normals, Sup35p es troba de forma soluble i funcional, i aquest estat es denota com [psi⁻]. Quan Sup35p adopta una conformació priònica agregada, apareix el fenotip [PSI⁺], on la proteïna perd parcialment la seva funció. Això provoca una supressió de les mutacions “nonsense” (codons STOP prematurs), generant variabilitat fenotípica.(21–23)

Les variants de [PSI⁺] es caracteritzen per diferències en la capacitat de supressió dels codons de parada i l'estabilitat mitòtica. Les variacions estructurals determinen les

propietats fenotípiques de cada variant.(22) El manteniment d'aquest estat agregat depèn de la capacitat d'aquests agregats en reclutar molècules solubles i convertir-les a la forma priònica. Les variants de [PSI⁺] han estat usualment classificades com a fortes i dèbils. Els estudis indiquen que les variants fortes, com el mateix nom indica, són més estables i presenten una supressió més robusta. El fet de tenir una variant o una altre depèn de diferents factors, però un dels més destacats és el fragment de Sup35 del qual provenen. Els fragments llargs solen generar variants més fortes.(21,22) Tot i això, altres estudis més recents indiquen que en una colònia priònica trobem mesclades de variants i no una variant homogènia. Aquest concepte és anomenat núvol de prions.(24)

La propagació dels prions es pot veure afectada per diferents motius. Les condicions de l'ambient i la presència de certes molècules condicionen l'herència de la forma [PSI⁺]. Una de les principals condicions que modifica aquest procés és la presència de la xaperona molecular **Hsp104**. Aquesta ha demostrat que trenca els agregats proteics donant lloc a la formació de fragments més petits, que posteriorment es repleguen. D'aquesta manera, la fragmentació i multiplicació de partícules priòniques completa el cicle de replicació del prió. Per tant, Hsp104 és un element clau i necessari per a l'herència d'aquest prió.(21,25,26)

Un dels factors externs que poden afectar a aquest equilibri dels prions és **la guanidina-HCL (GdnHCL)**. En diferents estudis s'ha demostrat que aquesta molècula és capaç de "curar" el prió [PSI⁺] en llevats. La GdnHCL actua inhibint l'activitat funcional de Hsp104, que com hem dit, és un factor clau en la propagació del prió agregat. El bloqueig impedeix la fragmentació dels agregats de Sup35p, i per tant limita la generació de noves llavors priòniques. A mesura que les cèl·lules es divideixen sense formar noves llavors priòniques, aquest [PSI⁺] s'acaba perdent, i la cèl·lula recupera el fenotip [psi⁻].(22,27–29) Estudis més recents corroboren aquesta teoria, però mostren que l'actuació de la GdnHCL no es limita només a Hsp104, sinó que presenta altres vies més complexes per revertir el fenotip [PSI⁺] a [psi⁻].(24)

Per tal d'identificar experimentalment els estats priònics en *S. cerevisiae*, és important destacar les diferències fenotípiques entre les soques [PSI⁺] i [psi⁻], especialment pel que fa a la coloració de les colònies.(30)

Les soques de *S. cerevisiae* que presenten mutacions “nosense” en els gens ADE1 i ADE2 tenen interrompuda la via de síntesi de de l’**Adenina**. Això provoca l'acumulació d'intermediaris metabòlics que donen un color vermell a la colònia no priònica.(30,31)

- [psi⁻]: En aquestes cèl·lules la proteïna Sup35p es troba en la seva forma funcional i actua com a factor de terminació de la traducció. Això implica que les mutacions “nonsense” en ADE1 i ADE2 no es poden suprimir i, per tant, no es produeixen els enzims necessaris per a la biosíntesi d'adenina. Això condueix a l'acumulació d'intermediaris que donaran lloc a colònies de color vermell.
- [PSI⁺]: En aquest estat priònic, Sup35p forma agregats amiloides i perd parcialment la seva funció com a factor de terminació de la traducció. Això permet la supressió parcial de les mutacions “nonsense” i la síntesi (en major o menor grau) dels enzims implicats en la producció d'adenina. Les colònies resultants obtindran un color més clar. (**Figura 3**)
 - En la variant forta de [PSI⁺], la supressió és més eficient i les colònies presenten un color blanc, indicant una restauració gairebé completa de la síntesi de l'adenina.
 - En la [PSI⁺] dèbil, la supressió és parcial i les colònies resultants tenen un color rosa.

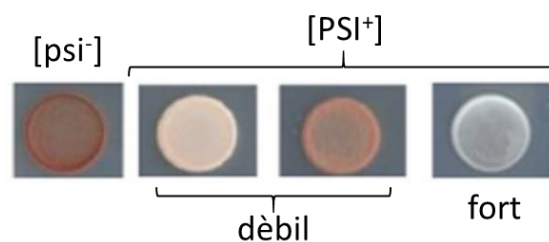


Figura 3. Coloració de les diferents soques de *S. Cerevisiae* en funció de l'estat del prió [psi⁻] i [PSI⁺].

Per tant, gràcies a aquestes diferències de coloració, es pot caracteritzar [PSI⁺] de manera ràpida. A més, també es poden observar els canvis que provoquen molècules com la GdnHCl. Aquesta, té un efecte antiamiloides a les cèl·lules, restaurant a l'estat [psi⁻], on fenotípicament es veuria com un canvi de color blanc/rosa a vermell.(30–32)

Paral·lelament, la no producció d'adenina per part de les soques no prioniques també permet una **diferenciació en medis selectius**. Al no produir adenina, [psi⁻] no poden créixer en medis selectius sense adenina. Per tant, aquesta és una altra manera de diferenciar [psi⁻] de [PSI⁺], on en un medi Drop Out sense adenina, els primers (la soca no prionica) no creixeran i els prionics si ho faran.(30–32)

Objectius

L'objectiu general del treball és utilitzar el sistema prònic de la proteïna Sup35p en llevats com una eina per detectar compostos amb potencial inhibidor de l'agregació amiloide. Disposar d'un model cel·lular eucariota que permeti, de manera ràpida i senzilla, avaluar si un compost presenta activitat antiamiloide és de gran utilitat. Aquest sistema podria servir per assajar i discernir la capacitat de diferents candidats com a inhibidors de l'agregació proteica. Constituiria un primer pas, útil, àgil i econòmic per trobar estratègies contra les malalties amiloides.

Per tal d'aconseguir aquest objectiu general, cal primer entendre bé el funcionament del sistema, fet que condueix als objectius específics del treball.

- Distingir clarament entre les soques [PSI⁺] i [psi⁻], tant a nivell fenotípic com visual.
- Demostrar que aquestes diferències són reproduïbles i detectables mitjançant l'ús de medis selectius i l'anàlisi de la capacitat de creixement.
- Explorar l'efecte de la GdnHCl sobre el fenotip prònic, observant de manera visual com canvia el fenotip [PSI⁺] a [psi⁻]. Això es manifesta amb un canvi de color de la colònia, de blanca a vermella.
- Avaluar l'efecte de compostos amb activitat antiamiloide coneguda, per determinar la seva capacitat d'inhibir l'agregació prònica de Sup35 en aquest model cel·lular.

Material i mètodes

Soques de llevat

Per a la realització dels experiments s'han utilitzat les soques de *Saccharomyces cerevisiae* L1749: Mata adel1-14 ura3-52 leu2-3, 112 trp1-289 his3-200 [psi⁻] [PIN⁺], i L1762: Mata adel1-14 ura3-52 leu2-3, 112 trp1-289 his3-200 strong [PSI⁺] [PIN⁺]. Aquestes soques han estat facilitades pel Dr. Mick Tuite, catedràtic de la University of Kent.

La soca L1749, amb fenotip [psi⁻] no priònic, presenta una coloració vermella, mentre que la soca L1762, amb fenotip [PSI⁺] priònic mostrarà colònies de color blanc.

A més, s'ha treballat amb una tercera soca prèviament modificada i preparada al laboratori. Aquesta soca expressa el pèptid amiloide Aβ42 (relacionat amb la malaltia d'Alzheimer) en lloc del domini N de la proteïna Sup35, obtenint la construcció anomenada AβMC. Aquesta soca serà de color blanc, igual que la priònica.

Medis de cultiu

Per al cultiu dels llevats s'han usat principalment dos medis: YPD (Yeast extract Peptone Dextrose) i medi mínim sense adenina (Dropout d'adenina). El medi YPD és un medi ric, àmpliament utilitzat per al creixement de llevats, ja que té tots els nutrients necessaris per fer créixer els llevats sense cap restricció. Per altra banda, el medi mínim sense adenina és un medi selectiu que permet discriminar els fenotips que no poden sintetitzar aquest compost, com el [psi⁻], que presenten una deficiència en la síntesi d'adenina i, per tant, no poden créixer eficaçment en aquest medi.

- YPD líquid: 20 g/L de peptona, 10 g/L d'extracte de llevat i 20 g/L de glucosa. Els dos primers components es mesclen i s'esterilitzen mitjançant l'autoclau. La glucosa s'hi afegeix posteriorment, esterilitzada per filtració amb filtres de porus de 0.2 µm, per evitar la reacció de Maillard que podria alterar les condicions del medi.
- Per a la preparació de plaques s'ha utilitzat ¼ YPD agar: 5 g/L de peptona, 2,5 g/L d'extracte de llevat, 20 g/L de glucosa i 15 g/L d'agar. Com en el cas anterior, tots

els components excepte la glucosa es poden autoclavar conjuntament. La glucosa s'hi afegeix posteriorment esterilitzada per filtració.

- Medi mínim sense adenina: Es va utilitzar extracte Dropout (sense histidina (His), leucina (Leu), tirosina (Tyr) i adenina). Els aminoàcids necessaris (His, Tyr i Leu) es van afegir a l'extracte per tal de completar el medi: 1,39 g/L d'extracte Dropout, 76 mg/L d'His, 76 mg/L de Tyr, 380 mg/L de Leu, 6,7 g/L de base nitrogenada de llevat sense aminoàcids i 40 ml/L de glucosa. Per a les plaques de medi mínim es prepara de la mateixa manera però afegint agarosa al 1,5 %.

Detecció d'agregats priònics mitjançant la determinació de l'absorbància i la fluorescència

Per a la detecció i quantificació dels agregats priònics s'han utilitzat els colorants **YAT2150** (component actiu del reactiu comercial **ProteoStat®**) i **Thioflavina S (ThS)**. El colorant YAT2150 ha estat recentment descrit com una eina eficaç per a la detecció d'estructures amiloides(33), on la seva intensitat de fluorescència augmenta en presència d'agregats proteics. Per la seva banda, la ThS és un colorant amb afinitat per les estructures amiloides riques en làmines β . S'uneix de manera específica a aquests dipòsits i emet fluorescència detectable.(34)

Per realitzar la detecció d'agregats amb aquets colorants primer es mesura l'absorbància de les mostres a 600 nm mitjançant un espectrofotòmetre UV-Vis, per tal d'igualar el nombre de cèl·lules a una $OD_{600nm} = 0,5$ mitjançant les dilucions pertinents en una solució amortidora de pH nativa (NB: 20 mM de Tris-HCl, pH 7,4 i 150 mM de NaCl). A continuació, s'incuben les mostres amb ThS a 25 μ M i YAT2150 a 5 μ M.

- La Thioflavina S (ThS) presenta una longitud d'ona d'excitació de 440 nm i una emissió màxima a 485 nm. Per tal de detectar la fluorescència emesa, es realitza un escaneig espectral des de 460 nm fins a 600 nm.
- Pel que fa al colorant YAT2150, la seva excitació es produeix a 465 nm, amb una emissió màxima a 595 nm. En aquest cas, s'enregistra l'emissió de fluorescència mitjançant un escaneig entre 500 nm i 700 nm.(33)

Lisi cèl·lules

El mètode utilitzat per lisar les cèl·lules és l'agitació amb boles de vidre. Aquestes s'afegeixen a la suspensió cel·lular i es realitzen tres cicles de vòrtex de 2 minuts cadascun. Un cop realitzats els tres cicles, les mostres es centrifuguen per separar el sobrenedant, que es recull per anàlisis posteriors. El sediment restant es resuspèn en el mateix volum de sobrenedant però amb NB.

Finalment, tant el sobrenedant com la fracció resuspesa s'incuben amb els colorants **YAT2150** i **ThS** per a la detecció de possibles agregats amiloides mitjançant fluorescència.

Guanidina

Per avaluar l'efecte de la guanidina (GdnHCl) sobre l'estat prònic de les soques, s'han utilitzat les variants L1762 i AβMC. Inicialment, es cultiven en medi YPD sòlid les dues soques per tal d'obtenir colònies blanques. A continuació, s'inoculen en YPD líquid suplementat amb 5 mM GdnHCl. Els cultius es deixen incubant durant 48 hores a 30 °C i 250 rpm.

Quan hagin transcorregut les 48 hores es dipositarà una gota en una placa ¼ YPD per veure si hi ha reversió fenotípica. A més, es transferirà una petita quantitat del cultiu que ha crescut en un altre medi líquid amb GdnHCl a la mateixa concentració. D'aquesta manera es realitzaran diferents cicles on les colònies creixeran sempre en presència de guanidina. Aquesta estratègia permet comprovar si l'exposició repetida a guanidina pot induir la reversió fenotípica de **[PSI⁺] (blanc)** a **[psi⁻] (vermell)**, indicativa de pèrdua de l'estat prònic.

Compostos antiamiloides

Seguint un procediment similar al de la guanidina, es van assajar tres compostos amb potencial activitat antiamiloides:

- **Quercetina** (Quer) i **apigenina** (API): flavonoides naturals amb activitat antiamiloides coneguda.(35–37)
- **DP128**: Compost experimental inhibidor de l'agregació amiloide.(38)

Tots tres compostos s'afegiran a diferents concentracions compreses entre 5 µM i 100 µM. S'incubaran en medi YPD líquid i el temps d'incubació serà de 48 hores a 30 °C i 250 rpm.

rpm. Com a control, s'ha inclòs una condició amb només DMSO per descartar efectes associats al solvent. Després de la incubació, es dipositen alíquotes dels cultius en plaques de YPD per observar l'estat fenotípic. A més, d'igual forma que amb la Guanidina, es realitzaran més cicles de creixement per veure si els compostos són capaços de revertir el fenotip priònic.

Resultats i discussió

Diferenciació de soques

Mitjançant el creixement de les tres soques en plaques ¼ YPD, s'ha aconseguit obtenir una diferenciació fenotípica clara i consistent entre elles (**Figura 4**). La soca L1749 [psi⁻] mostra un fenotip vermell intens que, com s'havia anticipat en la introducció, es coherent amb l'acumulació dels precursors d'adenina. Per contra, la soca [PSI⁺] (L1762) mostra un color blanc a les colònies, que coincideix amb el descrit prèviament a la bibliografia. Paral·lelament, la soca AβMC també mostra colònies blanques, d'igual manera que la [PSI⁺].

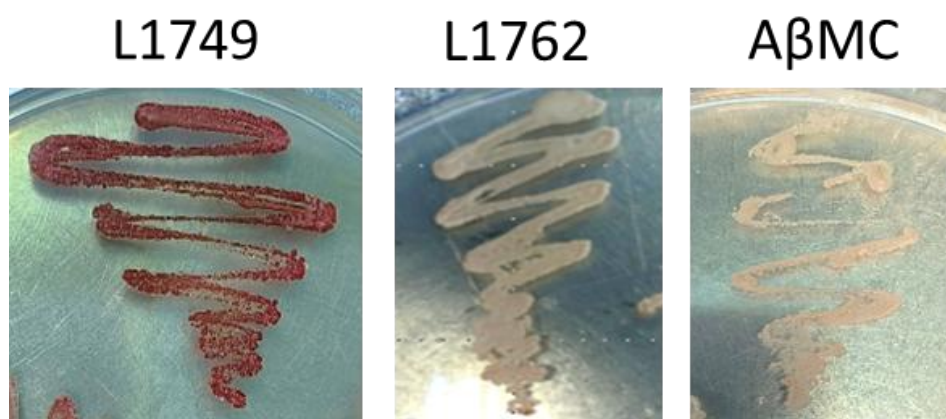


Figura 4. Diferents soques cultivades en plaques de medi ¼ YPD. A l'esquerra, es pot observar com la soca L1749, que és [psi⁻], presenta un color vermell. Les altres dues colònies, L1762 i Aβ, són blanques i, per tant, prioniques.

En alguns casos també s'han observat colònies rosades en les soques L1762 i AβMC, indicant un fenotip prionic més dèbil, tal i com s'ha explicat anteriorment.

Gràcies a aquest primer pas, s'ha pogut demostrat que és possible obtenir les soques ben diferenciades i que aquestes es poden distingir visualment de manera senzilla. Aquesta diferenciació fenotípica és clau per garantir la correcta identificació de cada soca i confirma que les condicions utilitzades són adequades per mantenir-ne l'estat fenotípic.

A continuació, es va voler comprovar si el medi selectiu sense adenina permet el creixement selectiu de les soques prioniques i no el de les soques no prioniques. Per fer-ho, es van cultivar les tres soques en medi YPD, i posteriorment es van dipositar gotes dels cultius en plaques amb medi selectiu mancat d'adenina (**Figura 5**).

Tal com s'observa a la **Figura 5**, la soca L1749 [psi⁻] no és capaç de créixer, en canvi, les soques priòniques si poden sobreviure. Això demostra que amb un medi selectiu sense adenina es poden identificar i diferenciar fàcilment les soques priòniques de les no priòniques.



Figura 5. Cultiu de les tres soques estudiades en medi selectiu mancat d'adenina. Es pot observar el creixement de les soques priòniques L1762 ([PSI⁺]) i Aβ, mentre que la soca L1749 ([psi⁻]) no és capaç de créixer en aquestes condicions.

Canvi de fenotip mitjançant incubació en GdnHCl

Una de les característiques del prió Sup35 és la seva capacitat de revertir el fenotip incubant les cèl·lules en presència de GdnHCl. Per comprovar aquest fet experimentalment i veure si érem capaços de revertir el fenotip de [PSI⁺] a [psi⁻], es van dur a terme diferents assaigs incubant les soques amb GdnHCl a una concentració de 5 mM.

En el primer experiment, l'objectiu era poder observar el canvi del fenotip en plaques ¼ YPD. Per aconseguir això, s'han cultivat les soques en YPD líquid amb 5 mM GdnHCl. Després de dos dies de creixement a 30 °C, s'ha fet un altre cicle de creixement, on s'agafa una petita mostra de les cèl·lules que han crescut en GdnHCl i es tornen a posar en medi líquid amb GdnHCl a la mateixa concentració. Posteriorment, es fa créixer una gota del cultiu en plaques ¼ YPD i es deixa créixer per observar la coloració. Com es pot observar a la **Figura 6**, la soca L1762 ([PSI⁺]), ha passat de color blanc inicial a color vermell. Això confirma que la guanidina és capaç d'inactivar l'agregació priònica i, per tant, va poder canviar del fenotip [PSI⁺] al fenotip [psi⁻]. En AβMC també s'ha observat un canvi de coloració, tot i que en aquest cas s'obté un color rosat indicant que la soca ha passat d'un estat priònic fort a un de dèbil.

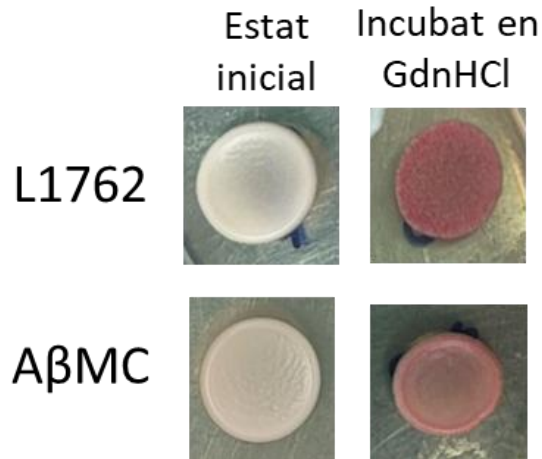


Figura 6. Observació del fenotip de les soques pròioniques L1762 i AβMC incubades en presència de GdnHCl.

Posteriorment, s'ha dut a terme un altre experiment on l'objectiu era observar l'evolució del color de les soques al llarg de diversos cicles d'incubació en GdnHCl. En aquest cas, després de cada cicle es feia créixer en placa ¼ YPD. Com es pot observar a la **Figura 7**, les cèl·lules anaven adquirint progressivament una coloració més vermella, indicant una transició gradual d'un estat [PSI⁺] fort a un estat [PSI⁺] dèbil, per posteriorment acabar en l'estat [psi⁻]. En aquest cas, la soca AβMC si ha revertit el fenotip a [psi⁻].

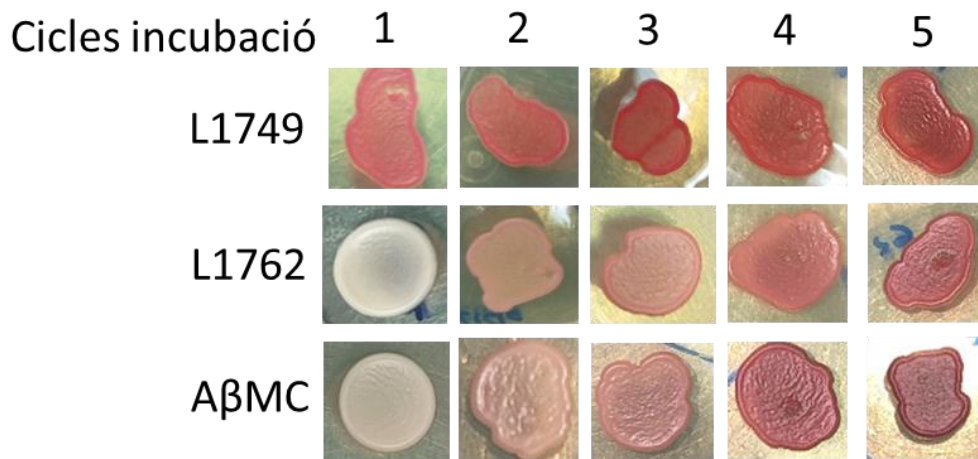


Figura 7. Les tres soques incubades en GdnHCl durant diferents cicles de 24 h cadascun. En la placa de ¼ YPD es pot observar com van canviant de fenotip al llarg dels diferents cicles.

Finalment, per confirmar la pèrdua funcional del fenotip [PSI⁺], es va realitzar un tercer experiment utilitzant el medi mínim sense adenina. Segons la teoria, les soques que han passat a l'estat [psi⁻] no haurien de ser capaces de créixer en aquest medi, ja que no poden compensar el defecte en la síntesi d'adenina.

Després de dos cicles d'incubació amb guanidina, es van sembrar les mostres en el medi selectiu. Es va observar una absència de creixement en les soques L1749 i L1762 (**Figura 8**). La soca L7149 és [psi⁻], per tant, ja era previsible que no creixes en aquest medi selectiu, però l'absència de creixement de L1762 confirma l'exitosa reversió del fenotip [PSI⁺] a [psi⁻] al fer créixer en presència de GdnHCl.

En canvi la soca Aβ va mostrar creixement, indicant que tot i observar colònies més rosades aquestes continuen sent prioniques.



Figura 8. Les tres soques cultivades en un medi selectiu sense adenina després de ser incubades amb GdnHCl durant 2 cicles. Com es pot observar, les soques L1762 i L1749 no han crescut, per tant la GdnHCl ha revertit el fenotip de la soca [PSI⁺] a [psi⁻]. En el cas de la soca AβMC, la GdnHCl no ha pogut fer el canvi de fenotip. La marca rodona que és veu en el lloc d'inoculació de L1749 i L1762 correspon al residu de la gota del cultiu original, no hi ha proliferació cel·lular. Per confirmar això, es va recollir mostra d'aquesta zona i es va incubar novament en medi YPD. El resultat va ser negatiu, ja que no es va observar cap tipus de creixement, confirmant així que la senyal observada inicialment no corresponia a cèl·lules viables.

Aquest conjunt d'experiments demostren que la guanidina, a la concentració utilitzada, és capaç d'eliminar el fenotip prionic de manera efectiva.

Un cop confirmada la capacitat de la guanidina per revertir el fenotip prionic associat a Sup35p suggereix que és possible inhibir o revertir aquest comportament mitjançant compostos que impedeixin l'agregació proteica. En el nostre constructe, on el domini N de Sup35 ha estat substituït pel pèptid β-amiloide (AβMC), hem observat que amb més cicles d'incubació el canvi de fenotip és possible. Aquesta observació obre la porta a dissenyar un nou model cel·lular per a l'estudi de possibles inhibidors de l'agregació proteica.

Diferenciació mitjançant fluorescència

Un dels objectius secundaris d'aquest treball és dissenyar un mètode que permeti diferenciar les soques [psi⁻] de les [PSI⁺] d'una manera més ràpida i senzilla que la visual comentada prèviament. Per aquest motiu, es va provar d'utilitzar dos marcadors fluorescents, la ThS i el YAT2150, tots dos específics per a la detecció d'estructures amiloides.

Abans de realitzar les mesures amb l'espectrofluorímetre, cal assegurar-se que totes les mostres tinguin la mateixa densitat cel·lular mitjançant l'ajust de la densitat òptica (OD_{600nm}) al mateix valor. D'aquesta manera, s'evita que les diferències en la fluorescència es deguin exclusivament a la quantitat de cèl·lules i es garanteix que siguin degudes a les pròpies característiques de les soques.

El primer marcador utilitzat va ser la ThS, a una concentració de 25 µM. Les mostres de les tres soques, prèviament ajustades a una OD_{600nm} = 0,5, es van incubar durant una hora amb la ThS i posteriorment es va mesurar la fluorescència amb l'espectrofluorímetre. Els resultats obtinguts van mostrar patrons de fluorescència molt similar entre les 3 soques (**Figura 9**). Això va indicar que ThS no és eficaç per diferenciar els diferents fenotips estudiats i, en conseqüència, no es considera adequada com a mètode per distingir entre soques en els posteriors assajos.

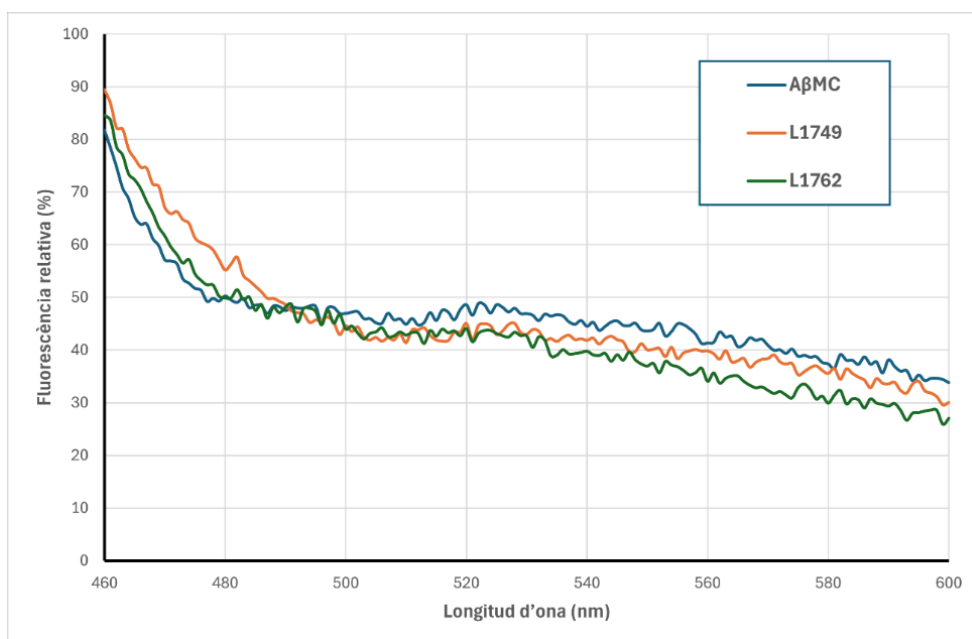


Figura 9. Espectre d'emissió de fluorescència de les tres soques estudiades marcades amb ThS.

El segon marcador usat va ser el YAT, a una concentració de 5 μ M, seguint el mateix procediment aplicat amb l'anterior marcador. En aquest cas, els resultats obtinguts sí mostraven diferències entre les soques [PSI⁺] (L1762 i A β MC) respecte de la [psi⁻] (L1749) (**Figura 10**). Per tant, a falta de més proves, el YAT2150 podria ser utilitzat com a marcador per distingir les diferents soques.

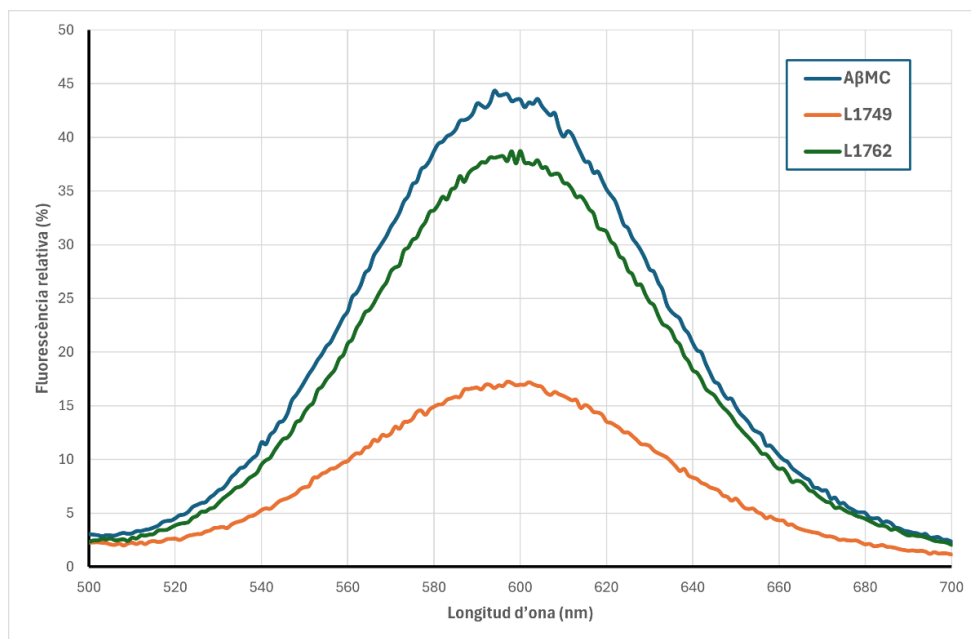


Figura 10. Espectre d'emissió de fluorescència de les tres soques marcades amb YAT2150.

Més endavant, es va dur a terme la lisi cel·lular amb l'objectiu de determinar si es podien obtenir diferències més clares entre soques priòniques [PSI⁺] i no priòniques [psi⁻]. Després de la lisi i la posterior centrifugació, es van analitzar amb YAT2150 la fracció soluble i el sediment.

Els resultats obtinguts mostren que, en les tres soques, la senyal fluorescent es localitza principalment en la fracció insoluble (**Figura 11**), on s'esperaria trobar les proteïnes agregades. Pel que fa a la fracció soluble (sobrenedant), la senyal observada és molt dèbil (comparada amb l'obtinguda a la fracció insoluble).

El senyal més fort l'ha donat A β , que presenta un pic més elevat de la fracció insoluble (**Figura 11**) Tot i això, la lisi cel·lular no permet distingir i diferenciar entre les soques L1762 i L1749, ja que el senyal que presenten és molt similar.

Per aquest motiu, es conclou que el procediment de lisi cel·lular previ a l'anàlisi de fluorescència no proporciona una millor diferenciació entre les soques en comparació amb l'anàlisi directa.

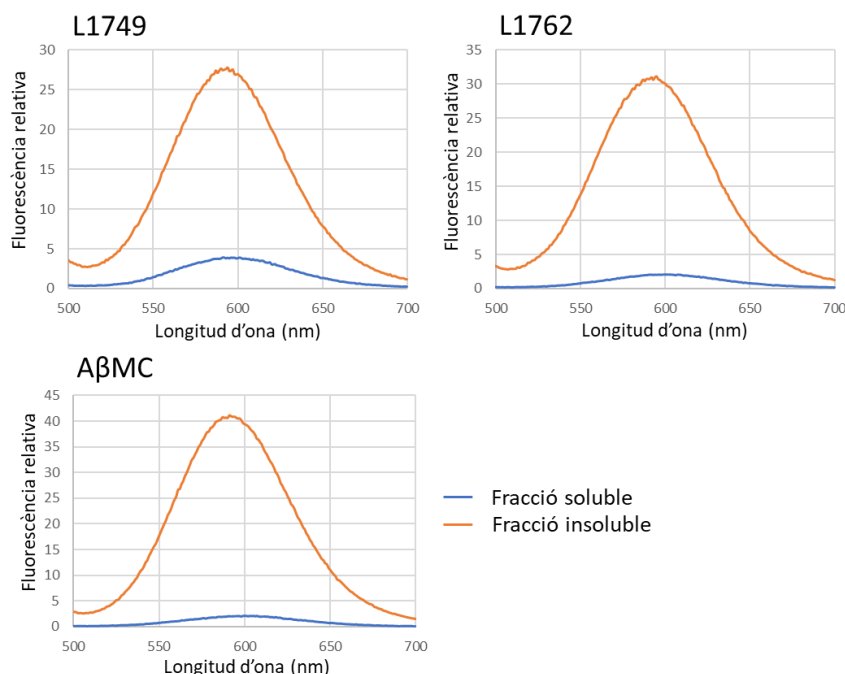


Figura 11. Espectre d'emissió de fluorescència de les tres soques marcades amb YAT2150. Es compara la senyal donada del sediment i de la part del sobrenedant. En tots 3 casos la senyal de la fracció insoluble és molt més elevada.

D'aquesta manera els resultats obtinguts amb els mètodes basats amb els colorants ThS i YAT2150 van ser finalment descartats, ja que no donaven resultats prou fiables. En els diferents assaigs realitzats no es van observar diferències significatives entre les 3 soques, fet que impedia una classificació clara entre soques priòniques i no priòniques.

Per aquest motiu, en els estudis posteriors es va decidir abandonar l'ús de tècniques de fluorescència basades en aquests colorants i centrar-se en mètodes alternatius que sí permetien una millor diferenciació entre fenotips.

Compostos Antiamiloides

En l'últim apartat del treball, s'ha provat l'efecte de 3 compostos amb activitat antiamiloide coneguda: DP128, quercetina i apigenina. L'objectiu, ja descrit anteriorment, és veure si els compostos són capaços de revertir el fenotip en les soques priòniques.

En aquests assaigs, els 3 compostos antiamiloides s'han usat a 20 μ M i s'han fet dos cicles per cada compost i soca. Es van cultivar inicialment en YPD líquid durant dos dies per cada cicle a 30 °C i en agitació.

En la primera observació visual, es va dipositar una gota de les colònies crescudes en presència de compostos en una placa ¼ YPD. Tal com es pot observar a la **Figura 12**, cap dels 3 compostos va aconseguir revertir completament el fenotip priònic, però sí que es va observar un canvi d'un fenotip [PSI⁺] fort a un fenotip feble, evidenciat per colònies amb una tonalitat més rosada.

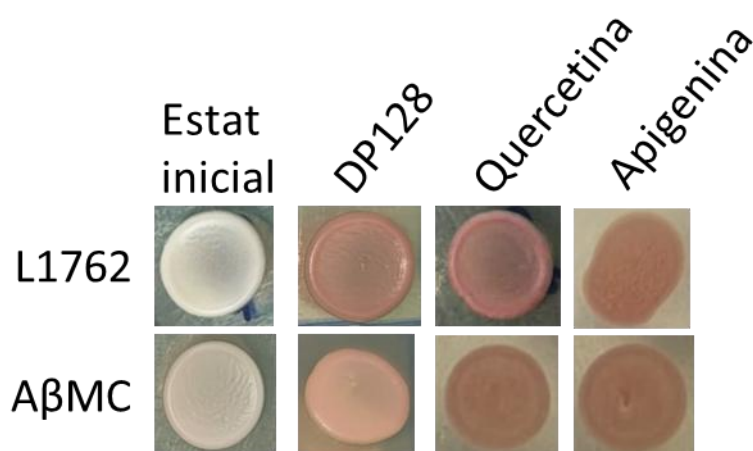


Figura 12. Soques Aβ i L1762 cultivades en ¼ YPD després de realitzar 2 cicles de tractament amb els compostos DP128, quercetina i apigenina a 20 μ M. Com es pot observar, les colònies presenten una coloració rosada.

Per un altre costat, es va comprovar el possible canvi de fenotip observant la capacitat de créixer en medi selectiu sense adenina. Com mostra la **Figura 13**, les dues soques han pogut créixer en el medi sense adenina independentment del compost amb el qual han estat cultivades. Aquests resultats concorden amb els observats anteriorment on hem vist que no hi ha un canvi de fenotip de [PSI⁺] a [psi⁻], sinó que passem d'un fenotip [PSI⁺] fort a un [PSI⁺] feble, fet que també s'observa en el medi selectiu on les colònies presenten un color rosat.

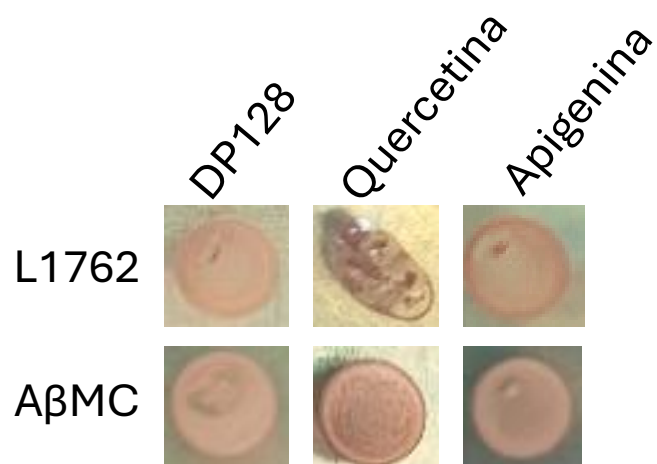


Figura 13. Soques A β i L1762 cultivades en medi selectiu sense adenina després d'estar cultivades amb 20 μ M de DP128, apigenina i quercetina. Com es pot observar, totes les colònies han pogut créixer, per tant, els compostos no han pogut revertir el fenotip, tot i així s'observa certa coloració rosada.

De manera similar al que s'ha descrit en els assajos amb GdnHCl, on son necessaris diversos cicles per aconseguir la conversió completa d'una soca priònica a una de no priònica, caldria dur a terme nous assajos amb més cicles d'incubació amb els diferents compostos inhibidors per avaluar-ne l'efecte a llarg termini. També seria interessant explorar l'efecte de concentracions de compostos més elevades.

Conclusions

Amb tot això, s'arriba a les següents conclusions:

1. Els mètodes visuals i de creixement en medis selectius permeten distingir clarament entre les soques [PSI⁺] i A β MC de la soca [psi⁻].
2. Les diferències entre els fenotips s'han pogut reproduir consistentment en diferents condicions experimentals, confirmant la robustesa del sistema.
3. El tractament amb guanidina ha permès revertir de manera eficaç el fenotip [PSI⁺] a [psi⁻], confirmant l'activitat antiprònica del compost i verificant la sensibilitat del sistema per detectar i visualitzar els canvis d'estat prònic.
4. L'assaig amb compostos amb activitat antiamiloides coneguda (DP128, quercetina i apigenina) no ha mostrat la reversió del fenotip al no prònic. Tant en el medi YPD com en el medi selectiu, les soques han mantingut el fenotip inicial, fet que indica que en les condicions utilitzades els compostos no han estat capaços d'induir la reversió a [psi⁻].

Tot i això, aquest model cel·lular representa un cribratge inicial prometedori en la detecció de compostos antiamiloides, per tant, se suggereix continuar amb el desenvolupament del sistema incloent altres condicions d'incubació, altres cicles d'exposició i altres concentracions de compostos.

Bibliografia

1. Balchin D, Hayer-Hartl M, Hartl FU. In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science*. juliol 2016;353(6294):aac4354.
2. Louros N, Schymkowitz J, Rousseau F. Mechanisms and pathology of protein misfolding and aggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. desembre 2023;24(12):912-33.
3. Olivares-Quiroz L, García-Colín Scherer L. Plegamiento de las proteínas: Un problema interdisciplinario. *Rev Soc Quím México*. març 2004;48(1):95-105.
4. Principles that Govern the Folding of Protein Chains | Science [Internet]. [citat 24 maig 2025]. Disponible a: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.181.4096.223>
5. Villegas-Morcillo A, Gomez AM, Morales-Cordovilla JA, Sanchez V. Protein Fold Recognition From Sequences Using Convolutional and Recurrent Neural Networks. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform*. novembre 2021;18(6):2848-54.
6. Fusco G, Chen SW, Williamson PTF, Cascella R, Perni M, Jarvis JA, et al. Structural basis of membrane disruption and cellular toxicity by α -synuclein oligomers. *Science*. 15 desembre 2017;358(6369):1440-3.
7. Bryngelson JD, Onuchic JN, Socci ND, Wolynes PG. Funnels, pathways, and the energy landscape of protein folding: A synthesis. *Proteins Struct Funct Bioinforma*. 1995;21(3):167-95.
8. ResearchGate [Internet]. [citat 26 maig 2025]. (PDF) The Role of BiP Co-chaperone SIL1 in Marinesco Sjögren Syndrome Pathogenesis. Disponible a: https://www.researchgate.net/publication/349105705_The_Role_of_BiP_Co-chaperone_SIL1_in_Marinesco_Sjogren_Syndrome_Pathogenesis
9. Iadanza MG, Jackson MP, Hewitt EW, Ranson NA, Radford SE. A new era for understanding amyloid structures and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. desembre 2018;19(12):755-73.
10. Koo EH, Lansbury PT, Kelly JW. Amyloid diseases: Abnormal protein aggregation in neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci*. 31 agost 1999;96(18):9989-90.
11. Knowles TPJ, Vendruscolo M, Dobson CM. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. juny 2014;15(6):384-96.
12. Uversky VN. Mysterious oligomerization of the amyloidogenic proteins. *FEBS J*. juliol 2010;277(14):2940-53.
13. Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol*. febrer 2007;8(2):101-12.
14. Glabe CG, Kaye R. Common structure and toxic function of amyloid oligomers implies a common mechanism of pathogenesis. *Neurology*. 24 gener 2006;66(1_suppl_1):S74-8.
15. Glabe CG. Common mechanisms of amyloid oligomer pathogenesis in degenerative disease. *Neurobiol Aging*. 1 abril 2006;27(4):570-5.

16. Prusiner SB. Novel Proteinaceous Infectious Particles Cause Scrapie. *Science*. 9 abril 1982;216(4542):136-44.
17. Wickner RB, Edskes HK, Shewmaker F, Nakayashiki T. Prions of fungi: inherited structures and biological roles. *Nat Rev Microbiol*. agost 2007;5(8):611-8.
18. Kushnirov VV, Dergalev AA, Alieva MK, Alexandrov AI. Structural Bases of Prion Variation in Yeast. *Int J Mol Sci*. 20 maig 2022;23(10):5738.
19. Prusiner SB. Neurodegenerative Diseases and Prions. *N Engl J Med*. 17 maig 2001;344(20):1516-26.
20. Ghaemmaghami S. Biology and Genetics of PrP Prion Strains. *Cold Spring Harb Perspect Med*. agost 2017;7(8):a026922.
21. Kushnirov VV, Vishnevskaya ,Aleksandra B., Alexandrov ,Ilya M., and Ter-Avanesyan MD. Prion and Nonprion Amyloids: A Comparison Inspired by the Yeast Sup35 Protein. *Prion*. 1 juliol 2007;1(3):179-84.
22. Kochneva-Pervukhova NV, Chechenova MB, Valouev IA, Kushnirov VV, Smirnov VN, Ter-Avanesyan MD. [PSI⁺] prion generation in yeast: characterization of the 'strain' difference. *Yeast*. 2001;18(6):489-97.
23. King CY. The Mutability of Yeast Prions. *Viruses*. 25 octubre 2022;14(11):2337.
24. Bateman DA, Wickner RB. The [PSI⁺] Prion Exists as a Dynamic Cloud of Variants. *PLOS Genet*. 31 gener 2013;9(1):e1003257.
25. Wickner RB, Edskes HK, Bateman DA, Kelly AC, Gorkovskiy A, Dayani Y, et al. Amyloids and Yeast Prion Biology. *Biochemistry*. 5 març 2013;52(9):1514-27.
26. Derkatch IL, Bradley ME, Zhou P, Chernoff YO, Liebman SW. Genetic and Environmental Factors Affecting the de novo Appearance of the [PSI⁺] Prion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 1 octubre 1997;147(2):507-19.
27. Eaglestone SS, Ruddock LW, Cox BS, Tuite MF. Guanidine hydrochloride blocks a critical step in the propagation of the prion-like determinant [PSI⁺] of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci*. 4 gener 2000;97(1):240-4.
28. Jung G, Masison DC. Guanidine Hydrochloride Inhibits Hsp104 Activity In Vivo: A Possible Explanation for Its Effect in Curing Yeast Prions. *Curr Microbiol*. 1 juliol 2001;43(1):7-10.
29. Ferreira PC, Ness F, Edwards SR, Cox BS, Tuite MF. The elimination of the yeast [PSI⁺] prion by guanidine hydrochloride is the result of Hsp104 inactivation. *Mol Microbiol*. 2001;40(6):1357-69.
30. Kushnirov VV, Dergalev AA, Alieva MK, Alexandrov AI. Structural Bases of Prion Variation in Yeast. *Int J Mol Sci*. gener 2022;23(10):5738.
31. Bharathi V, Girdhar A, Prasad A, Verma M, Taneja V, Patel BK. Use of ade1 and ade2 mutations for development of a versatile red/white colour assay of amyloid-induced oxidative stress in *saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2016;33(12):607-20.

32. Derkatch IL, Bradley ME, Masse SVL, Zadorsky SP, Polozkov GV, Inge-Vechtomov SG, et al. Dependence and independence of [PSI⁺] and [PIN⁺]: a two-prion system in yeast? *EMBO J.* 2 maig 2000;19(9):1942-52.
33. Álvarez-Berbel I, Llabrés S, Domènech Ò, Busquets MA, Fernàndez-Busquets X, Arce EM, et al. YAT2150: Overcoming limitations of traditional amyloid dyes in aggregation studies. *Bioorg Med Chem.* 1 juny 2025;123:118163.
34. Pouplana S, Espargaro A, Galdeano C, Viayna E, Sola I, Ventura S, et al. Thioflavin-S Staining of Bacterial Inclusion Bodies for the Fast, Simple, and Inexpensive Screening of Amyloid Aggregation Inhibitors. *Curr Med Chem.* 21(9):1152-9.
35. Espargaró A, Ginex T, Vadell M del M, Busquets MA, Estelrich J, Muñoz-Torrero D, et al. Combined in Vitro Cell-Based/in Silico Screening of Naturally Occurring Flavonoids and Phenolic Compounds as Potential Anti-Alzheimer Drugs. *J Nat Prod.* 24 febrer 2017;80(2):278-89.
36. Amini R, Yazdanparast R, Bahramikia S. Apigenin reduces human insulin fibrillation *in vitro* and protects SK-N-MC cells against insulin amyloids. *Int J Biol Macromol.* 1 setembre 2013;60:334-40.
37. Alghamdi A, Birch DJS, Vyshemirsky V, Rolinski OJ. Impact of the Flavonoid Quercetin on β -Amyloid Aggregation Revealed by Intrinsic Fluorescence. *J Phys Chem B.* 29 setembre 2022;126(38):7229-37.
38. Di Pietro O, Pérez-Areales FJ, Juárez-Jiménez J, Espargaró A, Clos MV, Pérez B, et al. Tetrahydrobenzo[*h*][1,6]naphthyridine-6-chlorotacrine hybrids as a new family of anti-Alzheimer agents targeting β -amyloid, tau, and cholinesterase pathologies. *Eur J Med Chem.* 12 setembre 2014;84:107-17.