

## Rafael Giraldo Suárez

Profesor de Investigación  
rgiraldo@cib.csic.es



**PhD, 1991**  
Universidad Complutense de Madrid  
**Postdoctoral, 1992-1994**  
División de Estudios Estructurales,  
Laboratorio de Biología Molecular del MRC  
(Cambridge, UK)  
**Investigador Contratado MEC, 1995-1999**  
**Científico Titular, 2000-2008**  
**Investigador Científico, 2008-2009**  
**Profesor de Investigación, 2010**  
CIB, CSIC  
**Miembro, 2010**  
Academia Europea

### Investigadores del equipo | Staff scientists:

M. Elena Fernández-Tresguerres Rodríguez-Vigil  
Juan Francisco Giménez Abián

### Otros miembros | Other lab members:

María Moreno del Álamo  
Cristina Fernández Fernández  
Fátima Gasset Rosa  
Laura Molina García  
Aída Revilla García  
Ana María Serrano López  
María Cruz Sánchez Martínez

@ <http://www.cib.csic.es/es/grupo.php?idgrupo=61>

# Ensamblajes Macromoleculares Microbianos Sintéticos

Mediante aproximaciones de Biología Sintética, desarrollamos módulos derivados de RepA, una proteína de replicación propia de plásmidos bacterianos, que permiten controlar el ensamblaje amiloide en condiciones cuasifisiológicas y construir en microorganismos una proteinopatía amiloide modelo genérica. Esperamos así poder deconstruir e intervenir las rutas y mecanismos de citotoxicidad compartidos entre las amiloidosis bacterianas y humanas.

Nuestro grupo desveló (1998-2008) el mecanismo que activa, en bacterias Gram-negativas, la replicación de plásmidos por proteínas de la familia RepA. Descubrimos que una conformación funcionalmente activa se selecciona por la unión de RepA a secuencias de DNA, que actúan como efectores alostéricos, y por la chaperona DnaK (Hsp70). Recientemente (2007-2012), encontramos que la unión al DNA también promueve *in vitro* el ensamblaje como fibras amiloides de un dominio "winged-helix" (WH1) en RepA, al igual que sucede con las proteínas causantes de las enfermedades espongiformes y de la enfermedad de Parkinson. Como prueba de concepto, la amiloidogénesis es inhibida por una molécula que interfiere con la unión de RepA-WH1 al DNA.

Durante los dos últimos años (2012-2014), hemos estudiado cómo se comporta RepA-WH1 *in vivo*. Cuando se expresa en *E. coli*, fuera de su contexto funcional natural y fusionada a una proteína marcadora fluorescente, RepA-WH1 causa una proteinopatía amiloide sintética. Aunque

no es un agente infeccioso, por lo que se considera un "prionoide", RepA-WH1 es capaz de moldear su conformación amiloide sobre moléculas de la misma proteína, tanto *in vitro* como *in vivo*. Hemos caracterizado, mediante microfluídica, su propagación vertical de célula madre a células hijas. Los linajes bacterianos transmiten epigenéticamente dos estirpes amiloides alternativas de RepA-WH1: múltiples partículas globulares de toxicidad aguda o un único agregado elongado, que reduce en menor medida la proliferación celular. La chaperona DnaK modula la interconversión entre ambas estirpes de RepA-WH1.

RepA-WH1 parece mimetizar fidedignamente en bacterias la patogenicidad que amiloides con relevancia clínica ejercen sobre las mitocondrias, orgánulos que descienden de α-proteobacterias de vida libre adquiridas como endosimbiontes. El prionoide bacteriano sintético RepA-WH1 es un modelo mínimo y bioseguro para desentrañar los mecanismos y vías comunes a las proteinopatías amiloides.

### Patentes | Patents

- Rafael Giraldo y María Moreno del Álamo. 25 septiembre 2013. *Anticuerpo monoclonal B3h7 anti-olígомерos amiloides RepA-WH1, hibridoma que lo produce y aplicaciones. OEPM / P201331391*

### Financiación | Funding

- CSD2009-00088 (MINECO)
- BIO2012-30852 (MINECO)

### Publicaciones Seleccionadas

#### Selected Publications

- Lane AB, Giménez-Abián JF, Clarke DJ [2013] A novel chromatin tether domain controls topoisomerase IIa dynamics and mitotic chromosome formation. *J Cell Biol* 203:471-486.
- Gasset-Rosa F, Coquel AS, Moreno-del Álamo M, Chen P, Song X, Serrano AM, Fernández-Tresguerres ME, Moreno-Díaz de la Espina S, Lindner AB, Giraldo R [2014] Direct assessment in bacteria of prionoid propagation and phenotype selection by Hsp70 chaperone. *Mol Microbiol* 91:1070-1087.
- Molina-García L, Giraldo R [2014] Aggregation interplay between variants of the RepA-WH1 prionoid in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 196:2536-2542.



# Synthetic Microbial Macromolecular Assemblies

By means of Synthetic Biology approaches, we are developing modules derived from RepA, a DNA replication protein in bacterial plasmids, which allow control on amyloid assembly under quasi-physiological conditions and the construction in microorganisms of a generic amyloid proteinopathy. We thus aim later to deconstruct, and enable intervention on, the pathways and mechanisms of cytotoxicity shared by human and bacterial amyloidosis.

Our group had pioneered (1998-2008) knowledge on the mechanisms enabling initiation of plasmid DNA replication, in Gram-negative bacteria, by proteins of the RepA family. We had discovered that a functionally active RepA conformation is selected by specific DNA sequences, acting as allosteric effectors, and by DnaK, a chaperone of the Hsp70 family. More recently (2007-2012), we found that binding to DNA also promotes *in vitro* the assembly into amyloid fibres of a winged-helix domain (WH1) in RepA, as described for proteins involved in spongiform encephalopathies and Parkinson's disease. As a proof of concept, RepA-WH1 amyloidogenesis can be inhibited by a molecule interfering with binding to DNA.

In the last two years (2012-2014), we have focussed our research on how RepA-WH1 behaves *in vivo*. When it is expressed in *E. coli*, uncoupled from its natural functional context as a fusion to a fluorescent protein reporter, RepA-WH1 causes a synthetic amyloid proteinopathy. Although RepA-WH1 is not infectious, therefore behaving as a 'prionoid', it templates the amyloid conformation by cross-seeding, both *in vitro* and *in vivo*. We have surveyed through microfluidics the vertical transmission of RepA-WH1 amyloidosis from mother to daughter bacterial cells. We have discovered that bacterial lineages epigenetically propagate two alternative amyloid strains of RepA-WH1: either multiple globular particles with acute cytotoxicity, or a single

elongated aggregate, mildly detrimental to cell proliferation. DnaK chaperone modulates the conformational switch between both strains of RepA-WH1.

RepA-WH1 seems to parallel in bacteria the pathogenicity of clinically relevant protein amyloids on mitochondria, organelles descending from free-living α-proteobacteria that subsequently underwent symbiosis. The bacterial synthetic prionoid RepA-WH1 might be a suitable, minimal and bio-safe model system for untangling key pathways common to amyloid proteinopathies.

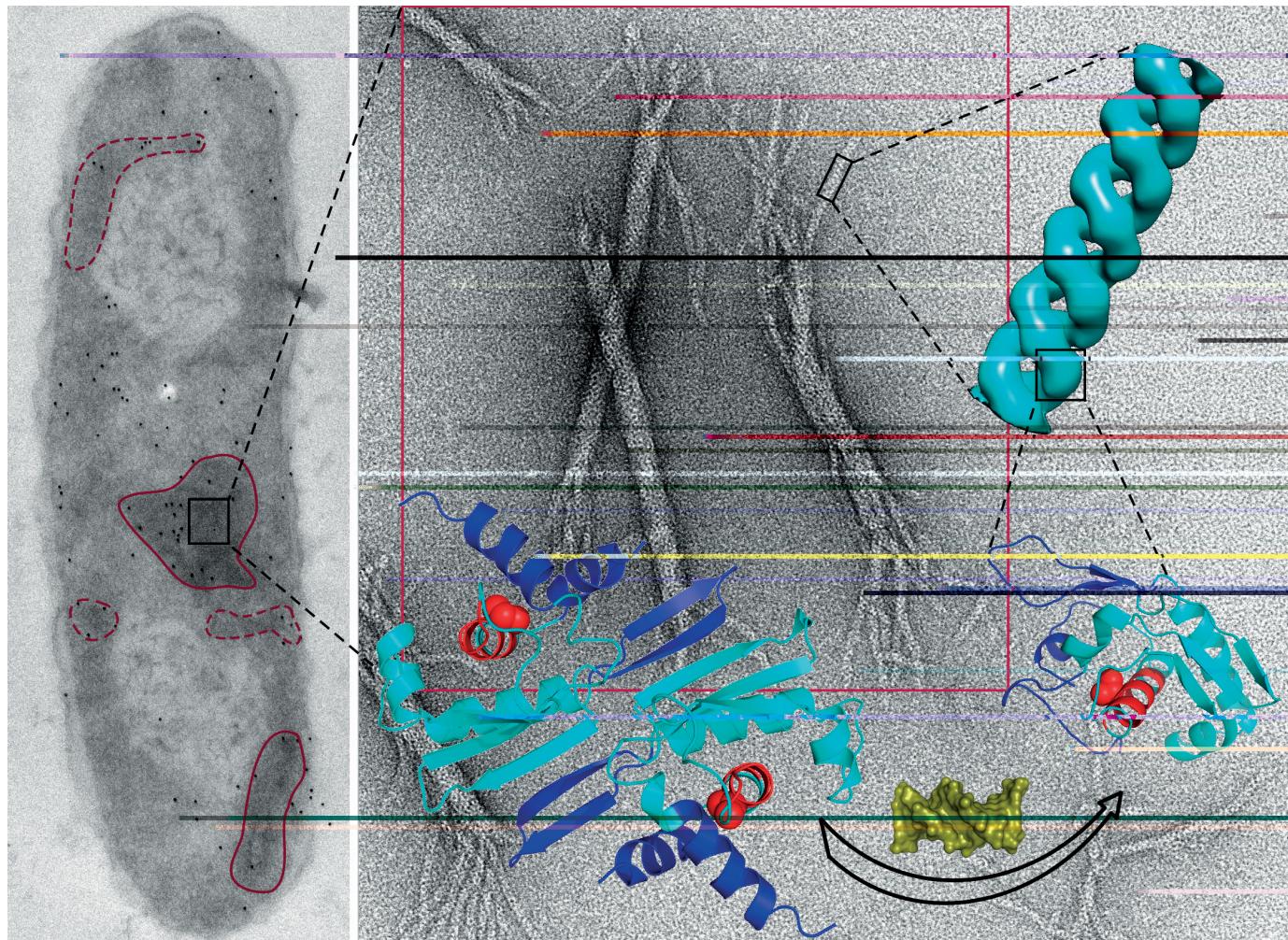


Figura 1 | Figure 1

La amiloidogénesis de RepA-WH1 *in vitro* (dcha.) implica la disociación, mediada por efecto (DNA), de dímeros en monómeros metaestables que se ensamblan jerárquicamente en filamentos y fibras amiloideas entrelazados. Estructuras resueltas en colaboración con A. Romero (2003) y O. Llorca (2015). En *E. coli* los agregados amiloideos (izda., sectores rojos) son citotóxicos y verticalmente transmisibles.

RepA-WH1 amyloidogenesis *in vitro* (right) implies effector (DNA)-mediated dissociation of dimers into metastable monomers that assemble hierarchically into intertwined amyloid filaments and variably twisted fibres. Structures solved in collaboration with the groups of A. Romero (2003) and O. Llorca (2015). In *E. coli*, amyloid aggregates (left, red sectors) are cytotoxic and vertically inheritable.