



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

**INFLUENCIA DE LA REGIÓN N-TERMINAL DE LA
PROTEÍNA DEL PRION EN LA SUSCEPTIBILIDAD AL MAL
PLEGAMIENTO, MANTENIMIENTO DE LAS
CARACTERÍSTICAS DE CEPA Y NEUROTOXICIDAD**

VANESA VENEGAS GARCÍA

LEIOA, 2018

TESIS DOCTORAL:

**INFLUENCIA DE LA REGIÓN N-TERMINAL DE LA
PROTEÍNA DEL PRION EN LA SUSCEPTIBILIDAD AL MAL
PLEGAMIENTO, MANTENIMIENTO DE LAS
CARACTERÍSTICAS DE CEPA Y NEUROTOXICIDAD**

VANESA VENEGAS GARCÍA

LEIOA, 2018

DIRECTORES:

Dr. Joaquín Castilla Castrillón

Dra. María de las Virtudes Geijo Vázquez

TUTOR:

Dr. Carlos José Matute Almu

SUMMARY/RESUMEN

THE ROLE OF THE PRP AMINO-TERMINAL REGION IN MISFOLDING PRONENESS, MAINTENANCE OF STRAIN FEATURES AND NEUROTOXICITY

Prion diseases, also known as transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), are incurable neurodegenerative disorders that affect both humans and animals. The cellular prion protein (PrP^C) undergoes a conformational change to a pathogenic isoform (PrP^{Sc}) with self-propagating capacity, and whose accumulation is associated with neurodegeneration. PrP^C is a glycosylphosphatidyl-inositol (GPI)-linked cell-surface protein that contains a globular articulated domain and a flexible N-terminal region. Distinct prion diseases have been described affecting different brain areas and resulting in clearly distinguishable clinical manifestations, caused by PrP^{Sc} with different conformations. These misfolded PrPs with identical amino acid sequences but responsible for clearly distinguishable pathologies are known as strains. It is thought that their strain properties are encoded in their three-dimensional structures. Moreover, it has recently been shown that different cofactors can play a key role in driving the conformational selection of prions, which is important to understand the pathogenesis of prion diseases and their ability to spread in a diversity of tissues or hosts.

The neurotoxic mechanism of the pathogenic isoform is still unknown. However, a large variety of recent studies coincide on the importance of the amino terminal end and, in particular, on the polybasic sequence of PrP (amino acids 27-31) as a modulator of the toxicity of certain PrPs with deletions, as a critical region for PrP^C to PrP^{Sc} conversion, and for the maintenance of prion strain features.

Using the technique Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA) that mimics the prion propagation (PrP^C to PrP^{Sc} conversion) *in vitro*, with a similar efficiency to the *in vivo* process, but with accelerated kinetics, it has been studied in detail the role that different deletions in the prion protein may have in the misfolding proneness, propagation and strain-feature maintenance *in vitro*. For this purpose, a variety of C- and N-terminal-deleted recombinant PrPs were generated. In this work, the misfolding ability of N-terminal region-deleted proteins was demonstrated using a preformed PrP^{Sc} acting as a seed for the initiation of the process, and spontaneously (without a seed). In these two processes of misfolding it was observed the generation of different conformational variants, or strains, independently of the use of a seed. The newly generated misfolded proteins were biochemically and biologically characterized, demonstrating their infectivity in mice. On the other hand, it was shown that the spontaneously generated misfolded proteins were influenced by a double selection when propagated in different substrates: one carried out by the polybasic region of the protein, and another one by an exogenous cofactor, which would favor the propagation of infectious conformations. Hence, this work confirms the relevance of the N-terminal region and specifically the polybasic sequence of PrP in three key events such as the misfolding susceptibility, strain-feature maintenance and neurotoxicity.

INFLUENCIA DE LA REGIÓN N-TERMINAL DE LA PROTEÍNA DEL PRION EN LA SUSCEPTIBILIDAD AL MAL PLEGAMIENTO, MANTENIMIENTO DE LAS CARACTERÍSTICAS DE CEPA Y NEUROTOXICIDAD

Las enfermedades priónicas, también conocidas como encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs), son enfermedades neurodegenerativas que afectan a humanos y animales, y para las que no existe cura. En su patogénesis juega un papel fundamental la proteína del prion celular (PrP^C) que al mal plegarse se transforma en una isoforma patógena (PrP^{Sc}) con capacidad autopropagativa y cuya acumulación está asociada a neurodegeneración. La PrP^C es una proteína de superficie celular unida a glicosilfosfatidilinositol (GPI) que contiene un dominio globular articulado y una región N-terminal flexible. Se han descrito diversas enfermedades priónicas que afectan a diferentes áreas del cerebro dando lugar a manifestaciones clínicas claramente distinguibles causadas por PrP^{Sc} con conformaciones diferentes. A estos priones con secuencias de aminoácidos idénticas pero causantes de patologías diferentes se las conoce como cepas y sus propiedades parecen estar codificadas en sus estructuras tridimensionales. Además, recientemente se ha demostrado que distintos cofactores pueden desempeñar un papel clave en la selección conformacional de priones, lo cual es importante para comprender la patogénesis de las enfermedades priónicas y su capacidad de propagación en diferentes tejidos o huéspedes.

El mecanismo neurotóxico de la isoforma patógena es aún desconocido. No obstante, numerosos estudios señalan la importancia del extremo amino terminal y, en concreto, la secuencia polibásica de la PrP (aminoácidos del 27-31) como moduladora de la toxicidad y como región crítica para la conversión de PrP^C a PrP^{Sc}, así como en el mantenimiento de las características de cepa.

Utilizando la técnica de amplificación cíclica de proteínas mal plegadas (del inglés, PMCA) que mimetiza la propagación de priones (conversión de PrP^C a PrP^{Sc}) *in vitro* con una eficiencia similar al proceso que ocurre *in vivo* pero con una cinética acelerada, se ha estudiado en detalle el papel de diferentes deleciones de la proteína priónica en el mal plegamiento, propagación y mantenimiento de las propiedades de cepa *in vitro*. Para ello, se generó una diversidad de PrPs recombinantes de ratón delecionadas tanto en la región C-terminal como en la N-terminal. En este trabajo se ha evaluado la capacidad de mal plegamiento de las proteínas delecionadas en la región N-terminal tanto inducida por una PrP^{Sc} preformada actuando como semilla iniciadora del proceso y también espontáneamente (sin semilla). En estos dos procesos de mal plegamiento se ha observado la generación de diferentes variantes conformacionales (posibles cepas), independientemente del uso de semilla. Las nuevas proteínas mal plegadas se han caracterizado bioquímicamente y biológicamente, demostrando su capacidad infectiva en ratones. Por otro lado, se ha demostrado que las proteínas mal plegadas generadas espontáneamente están sometidas a una doble selección cuando se propagan a expensas de diferentes sustratos: una efectuada por la región polibásica de la proteína y la otra llevada a cabo por un cofactor exógeno que favorecería la

propagación de conformaciones infecciosas. Así, este trabajo confirma la relevancia de la región N-terminal y en concreto la secuencia polibásica de la PrP en tres eventos clave como son la capacidad de mal plegamiento, la determinación de características propias de cepa y la neurotoxicidad.

ABREVIATURAS/GLOSARIO

Å	Ångström
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µm	Micrómetro
°C	Grado centígrado
139A	Cepa de prion ovino adaptado a ratón
2G11	Anticuerpo monoclonal anti-prion 2G11
22L	Cepa de prion de ratón denominada 22L
263K	Cepa de prion ovino adaptado a hámster
A	
Aβ	Péptido beta amiloide
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFM	Microscopía electrónica de fuerza atómica, del inglés <i>atomic force microscopy</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
B	
BCA	Del inglés <i>bicinchoninic acid</i>
BiP	Del inglés <i>binding immunoglobulin protein</i>
BSE	Del inglés Bovine Spongiform Encephalopathy
C	
C-terminal	Extremo carboxilo terminal de una proteína
CB	Del inglés <i>Conversion Buffer</i>
CC	Del inglés <i>charged cluster</i>
CD	Del inglés <i>Circular Dichroism</i>
CD	Del inglés <i>Central Domain</i>
CHO	Sitios de glicosilación
CMV	Citomegalovirus
COCS	Del inglés <i>cerebellar organotypic cultured slices</i>
D	
Da	Dalton
DE3	<i>Escherichia coli Rosetta</i>
DNAsa	Deoxirribonucleasa
dNTP	Del inglés <i>deoxynucleotide triphosphates</i>
DO ₆₀₀	Densidad óptica a 600nm
dpi	Días post inoculación
E	
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECJ	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob
ECJe	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica
EDC	Enfermedad debilitante crónica en ciervos
EDTA	Etilendiaminotetraacético
EEB	Encefalopatía espongiforme bovina
EEF	Encefalopatía espongiforme felina
EET	Encefalopatía espongiforme transmisible
eIF2α	Del inglés <i>eukaryotic translation initiation factor 2α</i>
EPR	Resonancia paramagnética electrónica, del inglés <i>electron paramagnetic resonance</i>
EtBr	Bromuro de etidio
ETV	Encefalopatía transmisible de visón
EUE	Encefalopatía espongiforme de ungulados exóticos
F	
F	Del inglés <i>forward</i>
FTIR	Del inglés <i>fourier transform infrared spectroscopy</i>
G	

<i>g</i>	Fuerza centrífuga relativa
GADD34	Del inglés <i>growth arrest and DNA damage-inducible protein</i>
GPI	Del inglés <i>glycosylphosphatidylinositol</i>
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker
H	
h	Hora
HC	Del inglés <i>hydrophobic core</i>
HE	Hematoxilina-eosina
H-EEB	Variante atípica de la encefalopatía espongiforme bovina (H, del inglés <i>high</i>)
HPLC	Del inglés <i>high-performance liquid chromatography</i>
HRP	Del inglés <i>horseradish peroxidase</i>
HSPG	Del inglés <i>Heparan Sulfate ProteoGlycans</i>
I	
IFF	Insomnio fatal familiar
IHQ	Inmunohistoquímico
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiraósido
K	
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramo
KO	Del inglés <i>knockout</i>
L	
LB	Luria Bertoni, medio de cultivo de bacterias
LD50	Dosis letal para el 50%, del inglés <i>lethal dose 50%</i>
L-EEB	Variante atípica de la encefalopatía espongiforme bovina (L, del inglés <i>low</i>)
M	
M	Molar
M20	anticuerpo policlonal anti-prion M20
ME	Microscopía electrónica
ME7	Cepa de prion ovino adaptado a ratón
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MS	Espectrometría de masas, del inglés <i>mass-spectrometry</i>
Mw	Marcador de peso molecular, del inglés <i>molecular weight</i>
N	
NA	No amplificado
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
Nor98	cepa de prion ovino atípica
O	
OPPF	Del inglés <i>Oxford Protein Production Facility UK</i>
OPRI	Del inglés <i>octapeptide repeat insertions</i>
OR	Octarepeticiones, del inglés <i>octapeptide repeats</i>
ORF	Marco abierto de lectura, del inglés <i>open reading frame</i>
P	
p/v:	Peso/volumen
PBS	Del inglés <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Del inglés <i>polymerase chain reaction</i>
PE	Del inglés <i>phosphatidylethanolamine</i>

PERK	Del inglés <i>Protein kinase RNA-like endoplasmis reticulum kinase</i>
PGE2	Prostaglandina E2
PG14	Ratón transgénico que expresa una PrP con una inserción de 9 octarepeticiones
PI-PLC	Del inglés <i>phosphatidylinositol-specific phospholipase C</i>
PIRIBS	Del inglés <i>Parallel in register β sheets</i>
PK	proteínasa K
PMCA	Del inglés <i>protein misfolding cyclic amplification</i>
PMCAa	PMCA automatizada
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
POM1	Anticuerpo monoclonal anti-prion POM1
POPG	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfo-(1'-sn-glicerol)
<i>Prnp</i>	Gen que codifica la proteína PrP
<i>Prnp^{0/0}</i>	Animal transgénico <i>knockout</i> para el gen que codifica la PrP
<i>Prnp^{+/-}</i>	Animal transgénico hemicígote para el gen que codifica la PrP
PrP	Proteína del prion
PrP*	Estado conformacional transitorio de la PrP, intermedio entre la PrP ^C y la PrP ^{Sc}
PrP ₂₇₋₃₀	PrP resistente a PK de 27-30 KDa
PrP ^C	Isoforma celular de PrP
PrP ^{Res}	PrP resistente a la digestión con PK
PrP ^{Sc}	Isoforma patógena de PrP
PrP ^{sen}	PrP ^{Sc} sensible a la digestión por PK
PVDF	Polifluoruro de vinilideno

Q

QuIC	Del inglés <i>quaking induced conversion</i>
------	--

R

R	Del inglés <i>reverse</i>
RE	Retículo endoplasmático
recPrP	PrP recombinante
recPrP ^{Res}	PrP recombinante resistente a la digestión con PK
RML	Cepa de prion ovino adaptado a ratón en el <i>Rocky Mountain Laboratory</i>
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROS	Del inglés <i>reactive oxygen species</i>
rpm	Revoluciones por minuto

S

s	Segundo
S-S	Puente disulfuro
Saf83	Anticuerpo monoclonal anti-prion Saf83
SDSL	Del inglés <i>site-directed spin labeling</i>
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico, del inglés <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEM	Del inglés <i>standard error of the mean</i>
SNC	Sistema nervioso central
SOD1	Del inglés <i>superoxide dismutase 1</i>

T

TEM	Microscopía electrónica de transmisión, del inglés <i>transmission electronic microscopy</i>
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β , del inglés <i>transforming growth factor β</i>
Tg20	Ratón transgénico que sobre expresa 10x la PrP
ThT	Del inglés <i>thioflavine T</i>

Tris-HCl Tris(hidroximetil)aminometano hidrocloreuro

U

UPR Del inglés *unfolded protein response*

V

v/v Volumen/volumen

vECJ Variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob

VPSPr Del inglés *variably protease-sensitive prionopathy*

W

WB Del inglés *Western blot*

wt Del inglés *wild-type*

Tabla de los 20 aminoácidos junto con su abreviatura y código

Nombre de aminoácido	Abreviatura	Código	Nombre de aminoácido	Abreviatura	Código
Alanina	Ala	A	Leucina	Leu	L
Arginina	Arg	R	Lisina	Lys	K
Asparagina	Asn	N	Metionina	Met	M
Ácido aspártico	Asp	D	Fenilalanina	Phe	F
Cisteína	Cys	C	Prolina	Pro	P
Glutamina	Gln	Q	Serina	Ser	S
Ácido glutámico	Glu	E	Treonina	Thr	T
Glicina	Gly	G	Triptófano	Trp	W
Histidina	His	H	Tirosina	Tyr	Y
Isoleucina	Ile	I	Valina	Val	V

ÍNDICE

SUMMARY/RESUMEN	5
ABREVIATURAS/GLOSARIO	11
ÍNDICE	17
INTRODUCCIÓN	23
1. Encefalopatías espongiformes transmisibles: desde su descripción hasta la determinación del agente causal	25
1.1. <i>Revisión histórica y aspectos generales</i>	25
1.2. <i>La hipótesis de “solo proteína”</i>	28
1.3. <i>Aparición de nuevas enfermedades priónicas en animales</i>	31
1.4. <i>La crisis de las vacas locas</i>	32
2. La biología de los priones.	33
2.1. <i>El gen de la PrP: Prnp</i>	33
2.2. <i>Mecanismos de conversión a PrP^{Sc}</i>	44
2.3. <i>Diseminación de la PrP^{Sc}</i>	48
2.4. <i>La diversidad de los priones</i>	50
3. Barrera de transmisión.	54
4. Generación y propagación <i>in vitro</i> de priones.	57
4.1. <i>Ensayo de conversión libre de células</i>	57
4.2. <i>Conversión inducida por agitación o QuIC</i>	58
4.3. <i>Amplificación cíclica de proteínas mal plegadas (PMCA)</i>	58
5. Modelos animales para el estudio <i>in vivo</i> de priones	61
5.1. <i>Modelos Prnp-knockout</i>	61
5.2. <i>Modelos en barreras de transmisión</i>	62

5.3.	<i>Modelos animales y el concepto de cepa.....</i>	63
5.4.	<i>Modelos de sobreexpresión de Prnp o formas mutadas de las proteínas.....</i>	63
5.5.	<i>Modelos animales para el estudio de enfermedades priónicas espontáneas.....</i>	64
5.6.	<i>Modelos animales que expresan formas truncadas de la PrP^C.....</i>	65
6.	Neurotoxicidad.....	67
6.1.	<i>Neurotoxicidad y la región N-terminal de la proteína priónica.....</i>	69
7.	Factores celulares que determinan la conversión de la PrP^C y la propagación de los priones.....	76
	OBJETIVOS.....	79
	MATERIALES Y MÉTODOS.....	83
1.	Construcción del plásmido de expresión de la proteína del prion murina.....	85
2.	Construcción de los plásmidos de expresión de las diferentes PrPs murinas con delecciones.....	87
2.1.	<i>Selección de las mutaciones.....</i>	87
2.2.	<i>Diseño de oligonucleótidos.....</i>	88
2.3.	<i>Mutagénesis secuencial en dos pasos.....</i>	88
2.4.	<i>Clonación de las ORFs del gen que codifica para las diferentes PrPs murinas con delecciones en el vector de expresión de proteínas pOPIN E.....</i>	90
2.5.	<i>Mutagénesis basada en el uso de enzimas de restricción.....</i>	91
3.	Construcción de los plásmidos de expresión de las PrPs con delecciones derivadas del vector pOPIN F PrP_{Δ51-90} L08I.....	93
3.1.	<i>Selección de las mutaciones.....</i>	93
3.2.	<i>Diseño de oligonucleótidos.....</i>	94
3.3.	<i>Mutagénesis secuencial en dos pasos.....</i>	94
3.4.	<i>Clonación de los genes que contienen las diferentes mutaciones murinas derivadas del vector pOPIN F PrP_{Δ51-90} L108I en el vector de expresión de proteínas pOPIN F.....</i>	95

4. Generación de las proteínas recombinantes	97
4.1. <i>Transformación de plásmidos en bacterias mediante choque térmico.....</i>	97
4.2. <i>Expresión de las proteínas recombinantes.....</i>	97
4.3. <i>Purificación de las proteínas recombinantes.....</i>	98
5. Preparación de sustratos para PMCA.....	98
5.1. <i>Sustratos basados en homogeneizados completos de encéfalo.....</i>	99
5.2. <i>Sustratos basados en PrP recombinante complementada con homogeneizado de encéfalo.....</i>	99
5.3. <i>Sustratos basados en PrP recombinante complementados con dextrano sulfatado.....</i>	100
6. Propagación <i>in vitro</i> de priones a través del uso de PMCA.....	100
7. Estudios bioquímicos de los priones	102
7.1. <i>Estudio de resistencia de los priones a la digestión con PK.....</i>	102
7.2. <i>Detección de proteínas mediante la técnica de Western blot.....</i>	102
7.3. <i>Cuantificación de bandas inmunoreactivas de PrP^{Pres}.....</i>	103
7.4. <i>Estudio del patrón de migración electroforética por Coomassie.....</i>	103
8. Estudios de infectividad <i>in vivo</i>.....	103
9. Estudio neuropatológico	104
10. Cumplimiento de las normativas éticas.....	105
RESULTADOS	107
1. Generación de PrPs recombinantes murinas con deleciones para estudiar su efecto sobre el mal plegamiento	109
2. Estudio de la capacidad de mal plegamiento inducido por semilla	111
3. Estudio de la capacidad de mal plegamiento espontáneo	112
4. Estudio de la capacidad de mal plegamiento de las proteínas con deleciones C-terminal inducida por semillas con una mayor similitud de secuencia.....	114
5. Caracterización bioquímica de las recPrP^{Pres} generadas espontáneamente.....	117

5.1.	<i>Evaluación de la capacidad de propagación</i>	117
5.2.	<i>Estudio de la resistencia a proteasas</i>	120
5.3.	<i>Ensayo de infectividad in vitro</i>	121
6.	Influencia de la región N-terminal en la determinación de las propiedades bioquímicas y biológicas de las recPr^{Pres} obtenidas de forma espontánea	122
6.1.	<i>Influencia de la región polibásica en la propagación in vitro y en la infectividad</i>	125
6.2.	<i>Estudio del mantenimiento de las propiedades de la recPr^{Pres} con deleciones tras su propagación en la proteína completa</i>	128
7.	Estudio del efecto de diferentes sustratos en la propagación de proteínas mal plegadas y el mantenimiento de sus propiedades bioquímicas y biológicas	130
7.1.	<i>Estudio del efecto de un sustrato complementado con homogeneizado de encéfalo de pollo sobre la propagación selectiva de determinadas proteínas mal plegadas</i>	131
7.2.	<i>Estudio del efecto del dextrano sulfatado en la propagación selectiva de determinadas proteínas mal plegadas</i>	132
8.	Estudio de infectividad utilizando la línea de ratón transgénico TgL108I	139
9.	Estudio neuropatológico	140
	DISCUSIÓN	143
	CONCLUSIONES	159
	BIBLIOGRAFÍA	163

INTRODUCCIÓN

1. Encefalopatías espongiformes transmisibles: desde su descripción hasta la determinación del agente causal

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs) o prionopatías son un grupo de enfermedades neurodegenerativas raras, mortales y transmisibles capaces de afectar tanto a humanos como a otros mamíferos (Collins, Lawson, & Masters, 2004; Imran & Mahmood, 2011a, 2011b). Entre las enfermedades que afectan a seres humanos se encuentran el kuru, el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ) y el insomnio familiar fatal (IFF); por otra parte, aquellas que afectan a animales: *scrapie* (tembladera o prurigo lumbar) en ovejas y cabras; la enfermedad debilitante crónica (EDC) que afecta a cérvidos (E. S. Williams & Young, 1980), encefalopatía espongiforme felina (EEF) observada en gatos domésticos (Pearson et al., 1992; J. Wyatt et al., 1991), encefalopatía transmisible del visón (ETV) (Marsh & Hadlow, 1992) y la encefalopatía espongiforme bovina (EEB), más conocida como el mal de las vacas locas, causante de una importante crisis en el sector ganadero (Wells et al., 1987).

Las EETs se caracterizan por largos periodos de incubación (desde meses hasta décadas) y por el desarrollo de alteraciones neuropatológicas diversas como disfunción motora, anomalías en el comportamiento, ataxia cerebral y deficiencia cognitiva. Las enfermedades priónicas no producen ningún tipo de respuesta inmune y hasta el momento no existe terapia efectiva para tratarlas.

La causa de estas enfermedades es el mal plegamiento de la proteína priónica celular (PrP^C) a una isoforma patogénica (denominada PrP^{Sc}) que es capaz de propagarse induciendo el mal plegamiento de más PrP^C. Este cambio conformacional causa importantes alteraciones en las propiedades bioquímicas y biológicas de la proteína, confiriéndole una mayor tendencia a la agregación, una alta insolubilidad en detergentes no iónicos, mayor resistencia a la desnaturalización térmica y química, resistencia parcial a la digestión por proteasas y propiedades neurotóxicas (Pruden, McAllister, Schultheiss, O'Toole, & Christensen, 2004).

1.1. Revisión histórica y aspectos generales

Los primeros indicios de las EETs se remontan a mediados del S.XVIII cuando ganaderos ingleses del área de Licolnshire observaron que una enfermedad fatal, rápidamente acuñada como *scrapie* (en castellano, tembladera) debido a la sintomatología que presentaban, se diseminaba entre las ovejas (McGowan, 1922). No obstante, fue alrededor de los años 30 cuando empezó a estudiarse la enfermedad de forma sistemática, demostrándose por primera vez su transmisibilidad de forma experimental entre el ganado ovino. Esta se basó en la inoculación intraocular en ovejas sanas con médula espinal procedente de una oveja infectada, lo cual sirvió además para confirmar el largo periodo de tiempo de incubación (Cuille & Chelle, 1936). Más tarde, en 1961 se demostró también su transmisibilidad de oveja a ratón, lo que permitió el desarrollo de un nuevo modelo de enfermedad más adecuado para estudios experimentales (Chandler, 1961).

A diferencia de otras enfermedades neurodegenerativas, solo las EETs son claramente transmisibles, aunque recientes investigaciones apoyan mecanismos de diseminación semejantes a los priones en enfermedades como alzhéimer y párkinson (Frost & Diamond, 2010). No obstante, la transmisión entre individuos es sólo una de las posibles vías de propagación de las EETs, es por ello que pueden clasificarse de la siguiente manera según su forma de adquisición o aparición:

- Las EETs genéticas se corresponden con mutaciones en el gen de la proteína priónica (*Prnp*). Estas mutaciones serían las causantes de facilitar el cambio conformacional de PrP^C a PrP^{Sc}. Hasta el momento todos los casos reportados presentan un patrón de herencia autosómica dominante. La presencia del polimorfismo Metionina o Valina en el codón 129 en el gen *Prnp* puede llegar a influir en la susceptibilidad del individuo (Collinge, 2001).
- Las EETs esporádicas poseen un origen desconocido, aunque se relacionan con mutaciones somáticas o fenómenos aleatorios y estocásticos de conversión espontánea.
- En el caso de las EETs adquiridas o iatrogénicas la aparición se deriva de la adquisición de priones exógenos por ingestión de tejidos de individuos afectados o exposición accidental durante la praxis médica u otros procedimientos quirúrgicos al utilizar material contaminado con priones. Este tipo de adquisición se observó en implantes de tejidos como córnea (Duffy P 1974), duramadre (Martínez-Lage et al., 1994) o en el uso terapéutico de derivados hipofisarios de origen humano, como sucedió en el caso de la hormona del crecimiento (Cochius, Hyman, & Esiri, 1992).

Fue en 1954 cuando Bjorn Sigurdsson, debido a los largos periodos de incubación que presentaba la transmisibilidad entre ovejas, se refirió por primera vez la enfermedad priónica como “infección causada por un virus lento” y propuso que un agente vírico no convencional podía ser la causa común de estas enfermedades infecciosas (Sigurdsson, 1954).

A la vez y de forma paralela a la “tembladera” del ganado ovino, en 1922 se acuñaba el término de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ) por Spielmeyer para la primera enfermedad priónica humana, basándose en descripciones de una nueva enfermedad neurológica compleja, de evolución rápida y que no se atribuía a ninguna entidad conocida; publicadas por los neurólogos alemanes Creutzfeldt (Creutzfeldt, 1920) y Jakob (Jakob, 1921). En los años siguientes, el término ECJ fue utilizado para encuadrar de forma amplia muchas enfermedades neurodegenerativas, de las cuales, algunas no cumplían con el actual criterio para diagnosticar una enfermedad priónica.

Tuvieron que pasar casi 40 años para descubrir una enfermedad en una comunidad indígena localizada en Papúa, Nueva Guinea, a la que se le denominó *kuru* (“escalofrío” en el idioma de los Fore) (D. Carleton Gajdusek, 1963) que afectaba especialmente a mujeres y niños. Los trabajos de D. Carleton Gajdusek (Premio Nobel de Medicina en 1976) y Vicent Zigas acerca de esta enfermedad entre 1954 y 1956 fueron claves para el desarrollo de las enfermedades priónicas. En

1959, Igor Klatzo (fue el primero en observar placas en cerebros afectados por *kuru*) relacionó rápidamente el *kuru* con la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (Klatzo, Gajdusek, & Zigas, 1959) y con la enfermedad de *scrapie* debido a la gran similitud neuropatológica y epidemiológica que presentaban. Estas evidencias y similitudes llevaron a pensar que quizás el *kuru* fuera también una enfermedad de naturaleza transmisible (Hadlow, 1959), hipótesis corroborada posteriormente mediante la inoculación por vía intracerebral de homogeneizados de cerebro infectados de *kuru* en chimpancés (D. C. Gajdusek, Gibbs, & Alpers, 1966). En 1968 se demostró la transmisibilidad de ECJ en la misma especie animal (Gibbs et al., 1968), relacionando definitivamente el *scrapie*, el *kuru* y la ECJ. Posteriores investigaciones en el campo sugirieron que el *kuru* era transmitido a través de prácticas caníbales en celebraciones de determinados ritos funerarios (Collinge, 2001).

En las décadas de los 80-90 se describieron nuevas patologías priónicas en humanos, como el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) (Boellaard & Schlote, 1980; K. Hsiao et al., 1989) y el insomnio familiar fatal (IFF) (Lugaresi et al., 1986; Medori et al., 1992). De la misma forma en que se había hecho anteriormente con el *kuru* y la ECJ, se confirmó la transmisibilidad del síndrome GSS en chimpancés (Masters, Gajdusek, & Gibbs, 1981). El hecho de que todas estas enfermedades pudieran transmitirse entre individuos, condujo a denominarlas “demencias transmisibles” aunque la naturaleza del agente infeccioso quedaba aún por resolver.

La gran variedad de signos neurológicos que presentan los afectados por EETs (ataxia cerebelar, hiperexcitabilidad, hiperestesia) y su similitud con las causadas por otros desórdenes neurológicos, hace que se requiera de un análisis histopatológico post-mortem del encéfalo para un diagnóstico definitivo. Las características principales que presentan son una degeneración espongiiforme o espongiosis (aparición de pequeñas vacuolas en el citoplasma de las células neuronales), gliosis astrocítica o astrogliosis reactiva (hipertrofia y proliferación de la astrogliá) y por último la presencia de acúmulos de la proteína priónica mal plegada (placas amiloides de PrP^{Sc}) (figura 1) (Beck E, 1987; Budka et al., 1995).

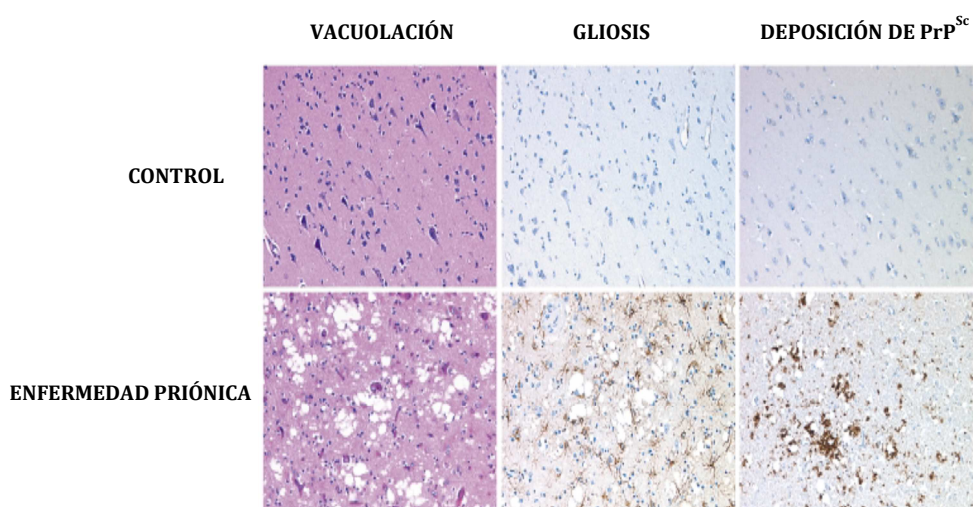


Figura 1. Características histopatológicas de las EETs. Análisis histológico e inmunohistoquímico de muestras de córtex frontal de pacientes sanos (Control) o pacientes con EETs (Enfermedad priónica). Vacuolación o degeneración espongiiforme observada tras la tinción con hematoxilina-eosina, y aguda muerte neuronal. Gliosis astrocítica observada por tinción inmunohistoquímica con anticuerpos anti-GFAP (del inglés Glial Fibrillary Acidic Protein) mostrando una proliferación de astrocitos reactivos. Deposición de PrP^{Sc} a nivel perivacuolar visualizada por inmunohistoquímica con anticuerpos anti-PrP. Adaptado de (Adriano Aguzzi, Fabio Montrasio, & Pascal S. Kaeser, 2001).

Estas características mencionadas constituyen la base del diagnóstico histológico, aunque el tiempo de incubación, los signos clínicos e incluso la deposición y acumulación de PrP^{Sc} pueden ser distintos entre diferentes regiones del Sistema Nervioso Central (SNC) y entre las diversas enfermedades priónicas. Por otra parte, los individuos afectados de una enfermedad priónica no manifiestan una respuesta inflamatoria o fiebre, es decir, no generan una activación del sistema inmunológico; ni tampoco la transmiten a través de la leche materna. Este hecho, entre otros, sembró dudas acerca del posible agente causal vírico y contribuyó a la propuesta de nuevas teorías como la posibilidad de un inusual agente causante de naturaleza proteica (N. J. Cobb & Surewicz, 2009).

1.2. La hipótesis de "solo proteína"

El revolucionario concepto de proteínas infecciosas fue desarrollado mediante la "hipótesis de sólo proteína" propuesta por Prusiner, neurólogo y bioquímico estadounidense (S. B. Prusiner, 1982). Sin embargo, la teoría no supuso el fin de la acalorada controversia alrededor de la naturaleza del agente infeccioso; la primera clasificación como virus lento fue ampliamente cuestionada ya que no había podido ser aislada ninguna partícula vírica y además, se daba una ausencia total de respuesta inmune frente a este agente. Los experimentos llevados a cabo por Alper y colaboradores merecen una mención especial, puesto que demostraron la gran resistencia a radiación ultravioleta, a formaldehído o a tratamientos por calor o nucleasas que presentaba el agente causal de las EETs, mayor de lo esperado para la inactivación de un patógeno basado en ácidos nucleicos (Alper, Cramp, Haig, & Clarke, 1967). Esta experimentación llevó a sugerir que el agente causal de las enfermedades priónicas no era ni un virus ni otro agente infeccioso portador de ácidos nucleicos, por lo que el matemático John S. Griffith propuso que podría tratarse de una glicoproteína que se auto replicaba a través de cambios conformacionales autocatalíticos en ausencia de ácidos nucleicos (Griffith, 1967).

Para verificar estas ideas, Stanley Prusiner (galardonado con el premio Nobel de Medicina en 1997), casi 15 años más tarde, sometió tejidos de animales afectados a compuestos utilizados habitualmente para desnaturalizar proteínas como son el fenol, la urea, el hidrocloreuro de guanidinio y detergente y observó que la infectividad desaparecía (S. B. Prusiner et al., 1981). Además, desarrolló protocolos efectivos de purificación que permitieron el análisis de fracciones ricas en partículas infecciosas, a partir de muestras de cerebros enfermos (Bolton, McKinley, & Prusiner, 1982; Meyer et al., 1986). Fue entonces, cuando en 1982 basándose en los estudios

teóricos de Griffith y sus propios estudios, propuso el término prion (del inglés *proteinaceous infectious particle*) para denotar una partícula infecciosa de naturaleza proteica (S. B. Prusiner, 1982); diferenciándolo de otros agentes patógenos como virus, viroides, bacterias, hongos o parásitos. Esta proteína aislada de homogeneizados de cerebros infectados por Bolton y colaboradores, se denominó PrP₂₇₋₃₀ ya que presentaba un peso molecular aparente de entre 27 y 30 kDa tras digestión parcial con proteasas. Ausente en encéfalos de animales sanos, esta proteína resistente a proteasas resultó ser el principal material de las fracciones infecciosas observándose que se acumulaba en los cerebros de pacientes afectados y se organizaba, en algunos casos, formando depósitos de amiloides (Bolton et al., 1982).

A principios de la década de los 80, se obtuvo también la primera evidencia morfológica del posible agente causal; concretamente, Patricia Merz y colaboradores observaron por primera vez estructuras fibrilares anormales en encéfalos de animales y humanos afectados por *scrapie*, ECJ y *kuru* utilizando tinción negativa en microscopia electrónica (ME) aunque los denominaron erróneamente como “virus filamentosos” (Merz, Somerville, Wisniewski, & Iqbal, 1981). De forma paralela, Prusiner y colaboradores vieron estructuras muy parecidas a las que denominaron “varillas de prion” y propusieron que podría tratarse de un amiloide.

El aislamiento y purificación de la PrP₂₇₋₃₀ permitió a Oesch y colaboradores demostrar que esta proteína estaba codificada en un gen de copia única y que provenía de una molécula más grande de 33-35 kDa (Oesch et al., 1985). De la misma forma, en el año 1986, Basler y colaboradores demostraron que el ARN mensajero (ARNm) que codifica la PrP era el producto de un gen de copia única (*Prnp*) que se expresa de forma constitutiva en el cerebro de animales sanos, así como en distintos tipos celulares. Así, se determinó que la PrP₂₇₋₃₀, conocida también como PrP^{Sc} (isoforma PrP *scrapie*, por su asociación con la enfermedad) y la PrP descubierta en animales sanos, denominada PrP^C (isoforma PrP celular, no asociada a la enfermedad) estaban codificadas en el mismo gen cromosómico (Basler et al., 1986).

Actualmente una gran variedad de datos respalda la hipótesis de “sólo proteína”, en la cual se propone que la PrP^{Sc}, una forma anormalmente conformada de la proteína del prion celular, es el único componente del agente infeccioso y que su propagación no implica la intervención de ácidos nucleicos. Inicialmente, al no haberse identificado diferencias en la secuencia de aminoácidos entre PrP^C y PrP^{Sc}, se planteó que la PrP^{Sc} se generaba a través de un proceso postraduccional de la PrP^C (Borchelt, Scott, Taraboulos, Stahl, & Prusiner, 1990; Caughey & Raymond, 1991). Sin embargo, dado que ni el análisis de la secuencia de aminoácidos, ni el estudio de modificaciones covalentes postraducionales revelaron diferencias entre ambas proteínas (N. Stahl et al., 1993), se propuso que la PrP^{Sc} actúa como molde que promueve la conversión de PrP^C a PrP^{Sc} y que esta conversión implica solamente un cambio conformacional. Mediante espectroscopía infrarroja con transformación de Fourier (FTIR, del inglés *fourier transform infrared spectroscopy*) y dicroísmo circular (CD, del inglés *circular dichroism*) se demostró que la conversión a PrP^{Sc} está asociada con una disminución en el contenido de hélices- α y un aumento

en la proporción de láminas- β (Grovetman et al., 2014; K. M. Pan et al., 1993; Pergami, Jaffe, & Safar, 1996).

El cambio conformacional mencionado le confiere nuevas propiedades bioquímicas a la proteína, como la insolubilidad en detergentes no iónicos (Meyer et al., 1986) y la resistencia parcial a la digestión con proteinasa K (PK) (Cohen & Prusiner, 1998). El tratamiento con PK elimina aproximadamente los primeros 90 aminoácidos del extremo amino terminal de la PrP^{Sc} dando lugar a la formación de un núcleo resistente de 27-30 kDa (PrP^{res}) distinguible de la proteína celular completa (33-35 kDa). El aumento en la proporción de láminas- β conduce a una agregación de la proteína anómala en fibras amiloides que se acumulan en el cerebro formando diversos tipos de depósitos (Fraser & Bruce, 1973). Estas fibras tienen la característica de ser resistentes a PK y ser reconocidas por anticuerpos generados frente a PrP, lo que las ha convertido a su vez, en marcador patognomónico de la enfermedad priónica, a pesar de que recientemente se han descubierto enfermedades priónicas causadas por formas de PrP^{Sc} sensibles a PK como la VPSPr (del inglés *Variably Protease-Sensitive Prionopathy*) (W. Q. Zou et al.). No obstante, en las EETs, el agente infeccioso se replica lentamente en el organismo, de modo que los niveles de PrP^{Sc} solo son detectables en los órganos donde esta se acumula y muy cerca de la fase sintomática de la enfermedad. No cabe duda de que el desarrollo de métodos de diagnóstico precoz *in vivo* para la detección de la PrP^{Sc}, o de marcadores secundarios, en otros tejidos o fluidos, como sangre, orina o líquido cefalorraquídeo, supondría un gran avance en la prevención de las EETs.

La constatación de que las formas familiares de las EETs están ligadas a mutaciones en el gen que codifica la PrP (Collinge, 2001; S. B. Prusiner, 1998) supuso otro apoyo a la hipótesis de “sólo proteína” dado que se observó que una vez que aparece la enfermedad genética, esta se puede propagar de manera infecciosa. Desde entonces y hasta la fecha se han identificado más de 40 mutaciones en el gen de la PrP humana que causan enfermedades priónicas de origen genético y que suponen alrededor del 10-15% de las enfermedades priónicas humanas, siendo el resto de origen infeccioso o las denominadas esporádicas, cuya causa se desconoce (Jeong & Kim, 2014). También el hecho de que los ratones *knock out* para el gen de la PrP^C no desarrollen una enfermedad tras ser inoculados intracerebralmente con priones, constituye una importante prueba a favor de la hipótesis de Prusiner, demostrando la necesidad de PrP^C como sustrato para la producción o formación de PrP^{Sc} (Bueler et al., 1993); máxime habiéndose demostrado que esta situación es reversible, es decir, que la susceptibilidad de estos ratones a priones murinos puede restablecerse reinsertando en su genoma el gen de la proteína del prion. Esto también confirmó que la PrP^{Sc} se acumula en el cerebro a través de la conversión de la PrP^C, y de ahí que el nivel de expresión de PrP^C está directamente relacionado con la tasa de formación de PrP^{Sc} e inversamente relacionado con el tiempo de incubación, como se vio en ratones hemicígotos para *Prnp* (*Prnp*^{+/-}) y que mostraban un tiempo de incubación muy prolongado frente a los homocígotos (Bueler et al., 1994). Finalmente, otro de los hitos importantes para la aceptación de esta hipótesis fue la demostración de la generación *in vitro* de priones infecciosos utilizando solamente PrP proveniente

de cerebro o recombinante (Castilla, Saa, Hetz, & Soto, 2005; Colby et al., 2009; Legname et al., 2004; Claudio Soto, 2011) o en combinación con ciertos cofactores como lípidos y ARN (Fei Wang, Wang, Yuan, & Ma, 2010).

1.3. Aparición de nuevas enfermedades priónicas en animales

Desde la descripción de la tembladera en ovejas hace más de 200 años, se han identificado diversas enfermedades priónicas en distintas especies de mamífero. Tras la enfermedad asociada al ganado ovino y caprino, se describieron enfermedades como la Encefalopatía Transmisible del Visón (ETV) (Marsh & Hadlow, 1992) y la enfermedad debilitante crónica (EDC) en el ciervo mula y el alce (E. S. Williams & Young, 1980). La primera, fue descrita por primera vez en una granja de cría de visones en EEUU en el año 1947 aunque no se observaron más brotes hasta 1960 en el mismo país. El origen de estos y otros brotes ocurridos en la época en Canadá, Europa occidental y en Repúblicas de la antigua Unión Soviética nunca ha podido confirmarse aunque las evidencias parecen señalar que la fuente podría ser el alimento contaminado con proteínas animales, como en el último brote descrito en Wisconsin, donde se identificó el posible origen en alimentos que contenían proteínas de vaca y caballo (Marsh, Bessen, Lehmann, & Hartsough, 1991; Marsh & Hadlow, 1992). En el caso de la enfermedad debilitante crónica, la primera observación de un episodio data de 1967 en un ejemplar de ciervo mula en cautividad en Colorado. La enfermedad que desde entonces se ha vuelto endémica en buena parte de Norteamérica se caracteriza por una pérdida de peso crónica que inevitablemente lleva a la muerte y que afecta a diversas especies de ungulados tanto salvajes como domésticos. A pesar de que no se ha observado por el momento transmisión a otros animales o seres humanos, la dimensión epidémica que ha alcanzado la enfermedad en cérvidos en Norteamérica, su reciente aparición en el norte de Europa (Benestad, Mitchell, Simmons, Ytrehus, & Vikøren, 2016) y la exitosa transmisión experimental realizada a monos ardilla (B. Race et al., 2014) exigen una intensiva vigilancia sobre las poblaciones de cérvidos salvajes y cautivos de las regiones afectadas. Además, parece ser que su propagación se da de forma horizontal entre animales por contacto directo o contaminación del ambiente, lo que dificulta el control y prevención de la enfermedad.

Poco después de la descripción de prionopatías en visones y cérvidos, se detectaron nuevas enfermedades priónicas en otros animales domésticos y en cautividad. Este es el caso de la prionopatía animal más devastadora y de mayor impacto social, la encefalopatía espongiiforme bovina (EEB), más conocida como “enfermedad de las vacas locas” (Wells et al., 1987). En esta misma época, se describió también la encefalopatía espongiiforme felina (EEF), detectada por primera vez en un gato doméstico en 1990 y con unos 80 casos diagnosticados en Reino Unido hasta el año 2000, o la encefalopatía espongiiforme de ungulados exóticos (EUE) descrita en ruminantes exóticos de la familia *Bovidae* de zoológicos británicos (Jeffrey & Wells, 1988; Kirkwood, Wells, Wilesmith, Cunningham, & Jackson, 1990; J. M. Wyatt et al., 1991). Las encefalopatías espongiiformes felina y la de ungulados exóticos presentan similitudes bioquímicas e histopatológicas a la EEB, lo que podría haber sido una transmisión (Imran & Mahmood, 2011a), a

lo que también apuntan los casos detectados en guepardos, pumas, ocelotes y tigres que consumieron carne de bovino cruda con SNC en zoológicos de Reino Unido (M. Bruce et al., 1994; Collinge, Sidle, Meads, Ironside, & Hill, 1996).

1.4. *La crisis de las vacas locas*

La descripción en 1985 de la EEB, popularmente conocida como la enfermedad o mal de las vacas locas, marcó un hito importante en el campo de las enfermedades priónicas debido al carácter epizootico. Esta enfermedad fue detectada por primera vez en una granja del sur de Inglaterra en una vaca frisona adulta, manifestándose clínicamente como una afección nerviosa acompañada de comportamiento agresivo y ansioso. Siete meses después, en febrero de 1986, ya eran nueve vacas del mismo rebaño las que presentaban los mismos signos clínicos que la primera. Los análisis anatomopatológicos de los cerebros afectados mostraron un patrón de lesiones muy semejante al descrito en ovejas y cabras afectadas por *scrapie* (J. Pattison, 1998). Al principio el origen de esta epidemia de EEB era incierto, pero poco tiempo después se atribuyó su rápida diseminación a la presencia de restos de animales afectados por enfermedades priónicas en harinas cárnicas destinadas a la alimentación del ganado bovino; lo que supuso la prohibición de estas harinas cárnicas en Julio de 1988. A pesar de la prohibición casi inmediata de estas prácticas, los efectos no fueron evidentes hasta 1993 cuando los casos diagnosticados por año comenzaron a disminuir. La importancia económica de esta devastadora enfermedad se refleja en su incidencia en ganado bovino, ya que desde 1985 hasta 2006 se contabilizaron unos 180.000 casos en Reino Unido [siendo estimados un total de un millón de afectados en el mundo (Anderson et al., 1996)], 44.000 de ellos surgidos tras la prohibición de 1988 y cuyo origen se atribuye a contaminaciones del alimento de rumiantes con el del ganado porcino o aviar, en los que no se prohibieron las harinas cárnicas hasta el 29 de Marzo de 1996 (Ray Bradley, Collee, & Liberski, 2006).

La gran repercusión social se debió a su potencial zoonótico y la crisis alimentaria que se desencadenó. En 1995 se diagnosticó el primer caso de ECJ en un adolescente británico y al poco tiempo, cuatro jóvenes más enfermaron mostrando una ECJ con una manifestación atípica. Las discrepancias respecto a las ECJ esporádica y genéticas se observaban en que las personas afectadas presentaban una juventud inusual, periodos más largos de la fase clínica y diferencias en el perfil de lesiones histopatológicas (J. Pattison, 1998). Debido a estas diferencias la nueva versión de ECJ se denominó como la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vECJ). La incidencia de esta nueva patología siguió creciendo en Reino Unido hasta alcanzar su máximo en el 2000 con más de 25 casos diagnosticados ese año (Ray Bradley et al., 2006). El análisis bioquímico realizado por Collinge y colaboradores de la PrP^{Sc} presente en los individuos afectados por vECJ demostró que el patrón de migración electroforética era claramente distinguible de las ECJ esporádicas y en cambio muy similar al patrón de la PrP^{Sc} de animales afectados por EEB. A partir de estas similitudes halladas se pudo establecer una relación entre la EEB y la vECJ, a pesar de que la vía de transmisión nunca fue definitivamente demostrada, la ruta más probable y con mayor aceptación en el campo, establece que pudo darse a través de productos cárnicos contaminados (Wilesmith,

Wells, Cranwell, & Ryan, 1988). Para el año 2006 ya se habían diagnosticado más de 300 casos de vECJ en Reino Unido e Irlanda del Norte, 16 en Francia, 3 en la República de Irlanda, 2 en Estados Unidos y 1 caso en Portugal, España, Italia, Países Bajos, Japón y Canadá, todos ellos países con casos previos de EEB (Donnelly et al., 1997). La ausencia de un método de diagnóstico eficaz que permitiera la identificación de animales en fases preclínicas obligó al sacrificio masivo de los animales como medida preventiva, evidenciando la necesidad urgente de profundizar en la etiología, patogenia y obtención de métodos de diagnóstico para esta enfermedad. La alarma social se vio incrementada además por la detección de transmisiones secundarias, de humano a humano, por vía iatrogénica en transfusiones de sangre (Collee, Bradley, & Liberski, 2006).

Desde entonces, el grupo de encefalopatías espongiformes bovinas transmisibles ha continuado creciendo. De hecho, dos variantes atípicas de EEB han sido descritas en vacas [L-EEB (Casalone et al., 2004) y H-EEB (Biacabe, Laplanche, Ryder, & Baron, 2004)].

2. La biología de los priones.

2.1. El gen de la PrP: *Prnp*

La secuenciación de una fracción proteica de 27-30kDa (PrP 27-30) presente en muestras de cerebro infectado por *scrapie* permitió la identificación de un gen, *Prnp*, cuyo producto coincidía exactamente con la secuencia aminoacídica de la PrP. Sorprendentemente, el mismo gen asociado a la PrP^{Sc}, pudo detectarse también en encéfalos de animales no afectados por la enfermedad, sugiriendo que esta proteína podría ser un componente propio del genoma del hospedador (Bruce Chesebro et al., 1985; Oesch et al., 1985). Basler y colaboradores en el año 1986 determinaron que la PrP^{Sc} y la PrP^C compartían la misma secuencia de aminoácidos y por tanto, el mismo gen (Basler et al., 1986).

El gen *Prnp* codifica la proteína priónica celular (PrP^C) y se expresa de forma constitutiva en prácticamente todos los tejidos del organismo, alcanzando su expresión máxima en tejidos neuronales, fundamentalmente en el cerebro, cerebelo e hipotálamo. Es un gen de copia única y con una secuencia altamente conservada en todos los mamíferos con un grado de identidad del 80-90%. Así mismo, se han descrito genes parálogos en aves (Gabriel, Oesch, Kretzschmar, Scott, & Prusiner, 1992), anfibios (Strumbo, Ronchi, Bolis, & Simonic, 2001), reptiles (Simonic et al., 2000) y peces (Cotto, André, Forgue, Fleury, & Babin, 2005) con un 30% aproximadamente de similitud respecto al de mamífero. El gen se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 20 en humanos, en el cromosoma 2 en ratones y en el 13 en vacas (Sparkes et al., 1986); cuyo marco abierto de lectura (ORF, del inglés *Open Reading Frame*) está contenido en un solo exón en todas aquellas especies de mamíferos y aves en las que se ha estudiado (Adriano Aguzzi & Calella, 2009); este hecho descarta un ajuste alternativo del ARNm (*Splicing*) como posible causa de la generación de la PrP^{Sc}. Las investigaciones establecieron que el gen de la PrP consta de 2 exones (en hámster, humanos y marsupiales), el primero no codificante y separado por un intrón de 10 kb del segundo (2 kb); o 3

(en rata, ratón, ovinos y bovinos) en función de la especie. En el caso de los primeros, el ORF se encuentra codificado en el segundo exón, mientras en los segundos, el ORF se encuentra en el tercero (Stanley B. Prusiner, Scott, DeArmond, & Cohen, 1998). El promotor del gen ha sido identificado en ratón, hámster, rata, vaca y humano, y se caracteriza por la ausencia de una caja TATA (Basler et al., 1986), la cual es sustituida por una región rica en GC que permite la unión de diversos factores de transcripción como: Sp1, AP-1 y AP-2 (S. Inoue, Tanaka, Horiuchi, Ishiguro, & Shinagawa, 1997; Sukhvir P. Mahal, Asante, Antoniou, & Collinge, 2001; Westaway et al., 1994). Se han descrito un amplio número de polimorfismos en las PrP de diversas especies, entre las que cabe resaltar el caso del codón 129 en humanos ya que es crítico en la susceptibilidad a ciertas prionopatías (Gambetti, Kong, Zou, Parchi, & Chen, 2003; Owen et al., 1990).

2.1.1. PrP^C

La traducción del gen *Prnp* tiene lugar en el retículo endoplasmático (RE) dando lugar a una proteína de entre 235 y 264 aminoácidos dependiendo de la especie, pero todas provistas de una señal peptídica de secreción en el extremo amino terminal que la dirige hacia la membrana plasmática. No obstante, la PrP^C se modifica postraduccionalmente en el RE donde esta señal peptídica se procesa eliminando los 22 aminoácidos que pertenecen a ella, además de darse la formación de un puente disulfuro, glicosilación en uno o dos Asparaginas y finalmente la adición del GPI (N. Stahl et al., 1993; Neil Stahl, Borchelt, Hsiao, & Prusiner, 1987). Una vez que es dirigida a la membrana, prácticamente toda la PrP^C se agrupa en balsas lipídicas (Taylor & Hooper, 2006) que son compartimentos dinámicos de la membrana celular, heterogéneos, resistentes a detergentes y ricos en lípidos como el colesterol, que sirven como focos de transducción de señales intracelulares (Simons & Toomre, 2000). Otra parte de la PrP^C producida es transferida a algunas zonas de la membrana recubiertas de clatrina donde queda sujeta a endocitosis y reciclaje constitutivo (Lloyd, Mead, & Collinge, 2011). Después de estas modificaciones postraduccionales, la proteína priónica madura posee alrededor de unos 210 aminoácidos y un peso molecular alrededor de 26-37 kDa dependiendo de su estado de glicosilación (no glicosilado, mono o diglicosilado). Su expresión comienza de forma temprana durante la embriogénesis y se expresa de forma prácticamente ubicua en todo el organismo, con los mayores niveles de expresión en las células del SNC en individuos adultos, principalmente en neuronas (J. Manson et al., 1992; Westergard, Christensen, & Harris, 2007).

Gracias al uso de la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) la estructura de la PrP^C ha podido ser dilucidada. El extremo amino terminal que abarca desde el aminoácido 23 hasta el 124 (en humanos) conforma un dominio flexible y poco estructurado (Riek, Hornemann, Wider, Glockshuber, & Wüthrich, 1997; Riek et al., 1998). Los residuos que van del 23 al 27 componen la denominada región polibásica (CC, del inglés *charged cluster*), importante para el correcto tráfico intracelular entre otras funciones (Sunyach et al., 2003). Otra pequeña región cargada se encuentra después de las octarepeticiones, la región polibásica se denomina CC1 y esta segunda región CC2. Flanqueada por estas regiones CC, se localiza la zona de octa repeticiones (OR, del inglés

Octapeptide Repeats) que se caracteriza por la presencia de 4 o 5 repeticiones (puede llegar a 6 o 7 en el caso de algunas especies como la vaca) de una secuencia variable de 8 aminoácidos (siendo de las más habituales PHGGGWGQ) y que se halla altamente conservada en todos los mamíferos (Zahn, 2003). La región de las octarepeticiones ha cobrado una gran importancia debido a la aparición de EETs genéticas caracterizadas por una expansión de OR (B. Li, Qing, Yan, & Kong, 2011; Stevens et al., 2009), aunque no sólo eso la hace importante ya que esta zona es capaz de unirse a cobre (D. R. Brown et al., 1997; Stöckel, Safar, Wallace, Cohen, & Prusiner, 1998) y otros iones bivalentes tales como el zinc y el níquel, lo que podría sugerir cierta relevancia en su actividad fisiológica (D. R. Brown, Clive, & Haswell, 2001; Pushie et al., 2011). Después de todo este dominio desestructurado y antes del dominio globular, se sitúa una región hidrofóbica conocida como HC (del inglés *Hydrofobic Core*).

El dominio globular, localizado en la región carboxi-terminal (C-terminal) de la proteína, es un dominio que se encuentra constituido por 2 pequeñas regiones de hoja- β separadas por la primera región α -helicoidal y seguidas de otras dos hélices- α (Riek et al., 1998). Además, en esta región también se encuentran tanto los dos sitios de N-glicosilación como las dos cisteínas que dan lugar a la formación del puente disulfuro intracatenario. Las glicosilaciones se dan de forma variable en dos Asparaginas (Asn-181 y Asn-197 en humanos y Asn-180 y Asn-196 en ratón) incorporadas en el aparato de Golgi produciendo PrP^C no glicosilada, monoglicosilada y diglicosilada. La proporción de cada una de estas tres formas varía entre diferentes cepas sirviendo para la distinción y caracterización de las mismas. Sin embargo, no se conoce qué papel pueden jugar los N-glicanos que pueden encontrarse en la PrP^C en su función biológica ni en el proceso de conversión de PrP^C a PrP^{Sc} (Adriano Aguzzi & Calella, 2009). Se cree que las glicosilaciones podrían tener un papel clave en la modulación de la estabilidad de la PrP^C y también su tráfico y distribución celular. Aunque la glicosilación no es un requisito para la propagación de PrP^{Sc}, sus alteraciones pueden ser determinantes en la susceptibilidad a la infección por priones, siendo características de cada cepa y presentándose como posibles marcadores de la enfermedad (Lawson, Collins, Masters, & Hill, 2005).

Finalmente, la región más C-terminal de la proteína priónica madura corresponde a la zona de anclaje por GPI que es anclado a la serina existente en la posición 231 en su proceso de maduración. Esta forma de anclaje a la membrana está altamente conservada en eucariotas, dado que alrededor del 10-20% de las proteínas de membrana se encuentran unidas a esta mediante GPI. La unión de GPI-proteína se da a través de una compleja vía en la que están implicadas más de 20 enzimas en unas 10 reacciones que tienen lugar en el RE y que no se conocen completamente. Todas las proteínas ancladas a través de GPI contienen una secuencia señal en el extremo amino terminal que las dirige al RE y una vez en este orgánulo, una segunda secuencia señal hidrofóbica del extremo carboxilo terminal es eliminada mediante una transaminidasa que añade a la proteína un GPI preformado. La estructura de todos los GPIs es compartida, se basa en una etanolamina fosfato unida mediante enlace amida al grupo carboxilo terminal de la proteína, con un núcleo

glicano altamente conservado compuesto de tres manosas, una glucosamina, un grupo fosfatidilinositol y colas fosolípídicas que anclan el GPI a la membrana. La diversidad de GPIs es amplia debido a las modificaciones que sufre a su paso por la vía secretora siendo la PrP^C una de las tres únicas proteínas conocidas que contienen ácido siálico en su GPI (Puig, Altmepfen, & Glatzel, 2014). La implicación del GPI en el desarrollo de la patología priónica ha sido demostrada en repetidas ocasiones. Por un lado, a través de la importancia que tiene para su localización en las balsas lipídicas, cuya alteración mediante compuestos que desestabilizan estas regiones de la membrana o mediante la expresión de una PrP mutada con capacidad para anclarse a otras zonas de la membrana, provoca una reducción o inhibición de la formación de PrP^{Sc} (Puig et al., 2014). Y por otro lado, mediante la generación de modelos transgénicos de ratón que expresan una PrP^C sin GPI (presentan mal plegamiento y placas de PrP^{Sc} al ser infectado por priones de ratón), los cuales muestran una ausencia de la marcada espongiosis que caracteriza a la gran mayoría de EETs, lo que sugiere una reducción de la neurotoxicidad (Bruce Chesebro et al., 2010).

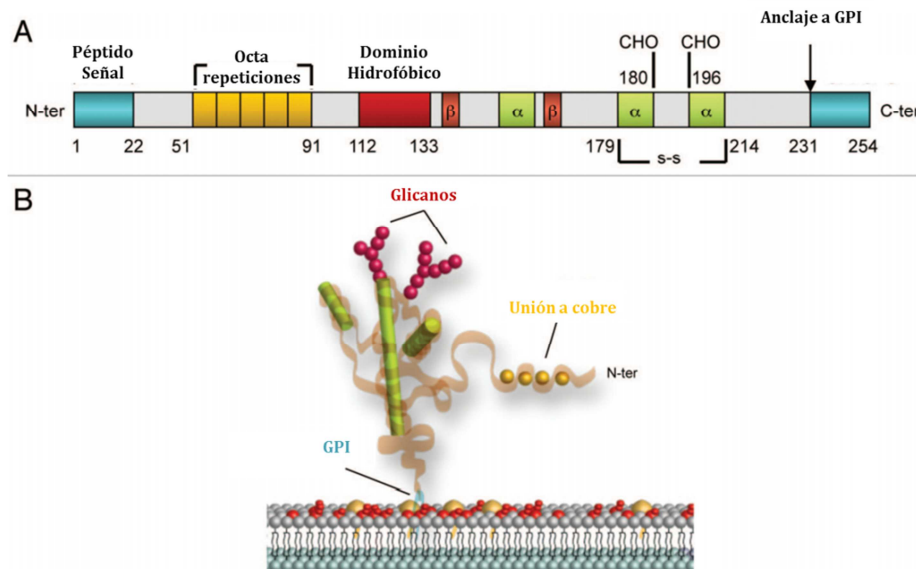


Figura 2. Representación esquemática de la PrP^C y estructura de la PrP^C resuelta por RMN. A) representación esquemática de la estructura primaria de la PrP^C y modificaciones postraduccionales. Los números hacen referencia a la posición de los aminoácidos. En el extremo N-terminal contiene una señal peptídica de secreción, seguido por la región de octa repeticiones (indicado en amarillo), tras la cual viene el motivo hidrofóbico que separa el dominio desestructurado y el globular, estructurado. Ya en el dominio globular se indican las estructuras secundarias que presenta, las 3 hélices- α (en verde) y las 2 hojas- β (en naranja). Se señalan además el puente disulfuro (S-S) y los dos sitios de glicosilación (CHO). Finalmente en el extremo C-terminal, se muestra en azul la zona de anclaje a membrana, donde se unen la proteína y el GPI. **B)** Estructura terciaria de la PrP^C deducida de RMN anclado a una membrana lipídica mediante el GPI (Petit, Besnier, Morel, Rousset, & Thenet, 2013).

En cuanto a la función fisiológica de la PrP^C, su alto grado de conservación en mamíferos a través de la evolución sugiere una función importante. Su expresión es mayoritaria en el SNC (H. R.

Brown et al., 1990; Kretzschmar et al., 1986), pero también se expresa en el sistema linfocítico, músculo esquelético, cardíaco, riñones, tracto digestivo, piel, plasma sanguíneo, glándulas mamarias y endotelio (Nuvolone, Aguzzi, & Heikenwalder, 2009). Debido a su ubicua expresión y distribución se relaciona con una amplia variedad de funciones fisiológicas.

Con la intención de determinar su función, se generaron varias líneas de ratones transgénicos desprovistos de la proteína priónica (KO del inglés *knockout*). De forma general estos ratones KO son viables, fértiles y no parecen tener ninguna anomalía anatómica ni en el desarrollo. Solamente se da una excepción en una de las líneas de ratones transgénicos que mostraron ataxia de inicio tardío asociada a la pérdida de células de Purkinje en el cerebelo, lo cual fue finalmente atribuido a la sobre regulación del gen adyacente que da lugar a Doppel (Moore et al., 1999). Más recientemente, cabras que de forma natural carecen de PrP^C han sido registradas en Noruega (Benestad, Austbø, Tranulis, Espenes, & Olsaker, 2012). Estas cabras parecen presentar un comportamiento totalmente normal y no poseen ninguna característica de significancia notoria que las hagan ser diferenciadas de su rebaño vecino.

Sin embargo, cuando la ausencia de PrP^C se estudia en detalle, los ratones KO para PrP^C muestran un funcionamiento anormal en sus ritmos circadianos, memoria, cognición, transmisión sináptica, olfato, así como alteraciones en su sistema inmunológico. Además, presentan niveles alterados del factor nuclear NF-kappa β , de la superóxido dismutasa dependiente de manganeso, de p53 y de melatonina entre otras (Linden et al., 2008; Nicolas, Gavín, & del Río, 2009; Steele, Lindquist, & Aguzzi, 2007). Una de las posibles funciones de la PrP^C mejor caracterizadas es su rol en la conservación de la integridad de la mielina periférica demostrada por Bremer y colaboradores. Tras la ablación de la *Prnp* en neuronas de cuatro cepas de ratón diferentes observaron que desarrollaban una polineuropatía demielinizante crónica, indicando que la expresión de PrP^C funcional en neuronas es indispensable para la conservación de la mielina (Bremer et al., 2010).

Algunos autores han asociado la PrP^C con funciones relacionadas con la adhesión celular, actividad enzimática, metabolismo del cobre, proliferación celular, supervivencia y diferenciación. En el sistema nervioso, la proteína celular del prion parece participar de forma activa en la traducción de señales (Collinge et al., 1994), plasticidad sináptica (Prestori et al., 2008), neurogénesis y formación de neuritas (S. Chen, Mangé, Dong, Lehmann, & Schachner, 2003), en la neuroprotección frente a estímulos pro-apoptóticos y especies reactivas de oxígeno (Chiarini et al., 2002; McLennan et al., 2004). Por otro lado, varios estudios indican la necesidad de una PrP^C funcional para que se genere la neurotoxicidad y la consiguiente neurodegeneración, como demuestra el estudio en el que un injerto que expresa PrP^C es implantado en el encéfalo de animales *Prnp*^{0/0} siendo el único tejido afectado por neurotoxicidad a pesar de que la PrP^{Sc} se diseminó por todo el encéfalo (S. Brandner et al., 1996).

Fuera del sistema nervioso, la PrP^C podría modular la respuesta de precursores de células del sistema inmunológico a moléculas de señalización extracelular (Ballerini et al., 2006; Mattei et al., 2004), controlar la diferenciación de células hematopoyéticas (C. C. Zhang, Steele, Lindquist, & Lodish, 2006), estar implicada en la diferenciación de las células del timo (Jouvin-Marche et al., 2006) y en la respuesta inflamatoria (de Almeida et al., 2005). Debido a su habilidad para modular la proliferación celular y la apoptosis, la proteína priónica ha sido relacionada con el desarrollo del cáncer y la progresión tumoral, al igual que con el proceso metastásico (Mehrpour & Codogno, 2010). Además, en los últimos años se sugiere que la PrP^C podría también estar implicada en la progresión de la enfermedad del Alzheimer promoviendo la producción del péptido A β (beta amiloide) (Parkin et al., 2007) y, probablemente con otros péptidos ricos en hoja- β implicados en otras enfermedades neurodegenerativas (Biasini, Turnbaugh, Unterberger, & Harris, 2012). Así que, aunque se sabe que la PrP^C participa en una gran cantidad de procesos biológicos fundamentales en la célula, su papel fisiológico necesita ser aún esclarecido.

2.1.2. PrP^{Sc}

Determinar las características bioquímicas y estructurales de la PrP^{Sc} es una ardua labor debido a las dificultades en su purificación a gran escala, su insolubilidad y su heterogeneidad, ya que está compuesta por diferentes polímeros de varios tamaños en equilibrio dinámico lo cual dificulta el estudio de la unidad básica de la PrP^{Sc} (Silveira et al., 2005). La hidrofobicidad de los agregados de la PrP^{Sc} es uno de los factores que dificulta su estudio, puesto que en las condiciones requeridas para la mayoría de estudios estructurales, la PrP^{Sc} forma agregados no cristalinos que no pueden solubilizarse con detergentes sin comprometer su infectividad (Gabizon, McKinley, & Prusiner, 1987). Otro de los problemas encontrados a la hora de determinar su estructura es la dificultad a la hora de purificar PrP^{Sc} de encéfalo debido a su carácter viscoso y a la presencia de contaminantes que co-purifican, como otras proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Además el alto peso molecular de los agregados de la PrP^{Sc} y las mezclas variables de formas sin glicosilar, monoglicosiladas y diglicosiladas, representan un obstáculo para la utilización de técnicas biofísicas clásicas como la RMN o la Cristalografía de rayos X (Diaz-Espinoza & Soto, 2012); esto conlleva a que el conocimiento acerca de la estructura de la isoforma causante de la enfermedad sea reducida, en contraste a la amplia información de la que se dispone sobre la estructura y ruta de biosíntesis de la PrP^C. Como ejemplo de ello, la estructura fisiológica de la PrP^C se dedujo en 1996 (Riek et al., 1996), pero la estructura tridimensional de alta resolución de la PrP^{Sc} sigue siendo desconocida, junto con los detalles mecánicos de su propagación.

Al igual que ocurre con otros aspectos de las enfermedades priónicas, los eventos moleculares que conducen a la conversión de la PrP^C en PrP^{Sc} son desconocidos, aunque según la hipótesis de "sólo proteína" tiene lugar un mal plegamiento proteico que se propaga de forma autocatalítica. Este mal plegamiento proteico da lugar a una reorganización estructural la cual confiere a la PrP^{Sc} nuevas propiedades químicas y físicas. La PrP^C, es rica en α -hélices (~40% hélice- α y ~3% hoja- β) mientras que para la PrP^{Sc}, se propuso una estructura rica en láminas β (~40% hoja- β y

~30% hélice- α) (J Safar, Roller, Gajdusek, & Gibbs, 1993). Sin embargo, evidencias en contra de la presencia de hélices α en la PrP^{Sc} han aparecido de la mano de técnicas biofísicas cada vez más sofisticadas como la RMN en estado sólido (Grovesman et al., 2014), por lo que a diferencia de un indudable aumento en la proporción de hoja β , la existencia de estructuras α helicoidales en la PrP^{Sc} sigue siendo controvertida. Por lo tanto, sólo se dispone de información estructural parcial, la cual proviene de técnicas de baja resolución y que de forma general no llegan a ningún consenso a la hora de establecer qué tipo de estructura explicaría las propiedades del prion infeccioso (Requena & Wille, 2014).

Se han utilizado diversas técnicas para intentar elucidar la estructura de la PrP^{Sc} como el mapeo de epítomos accesibles con diferentes anticuerpos monoclonales. A través de estos estudios se ha revelado que del residuo 90 al 120 aproximadamente hay una zona inaccesible a menos que se desnaturalice completamente la PrP mientras regiones del carboxilo terminal como las que se encuentran desde los aminoácidos 152-163 y de 225-231 son accesibles (Peretz et al., 1997). Técnicas como la microscopía electrónica de transmisión (del inglés *Transmission Electron Microscopy*, TEM) (McKinley, Braunfeld, Bellinger, & Prusiner, 1986) y algo más reciente la microscopía de fuerza atómica (del inglés *Atomic Force Microscopy*, AFM) (Sim & Caughey, 2009) han aportado también detalles sobre la ultraestructura de los agregados priónicos. La PrP^{Sc} purificada de encéfalo se visualiza en microscopía electrónica como agregados fibrilares de tamaños heterogéneos, aunque mediante protocolos exhaustivos de purificación que incluyen tratamientos prolongados con proteasas, se descubren estructuras reconocibles y bien definidas que se han denominado varillas priónicas (*prion rods*, en inglés). Estas varillas de entre 10 y 100 nm de largo y 5 nm de ancho son habitualmente más cortas que otras fibras amiloideas y no muestran diferencias apreciables para distintas cepas aunque ensayos de velocidad de sedimentación han demostrado ciertas diferencias en los patrones de distribución por tamaños para las distintas cepas (Tixador et al., 2010). A pesar de que no se han podido obtener cristales adecuados de PrP^{Sc} a partir de encéfalo para estudiar su estructura mediante cristalografía y difracción de rayos X, sí han podido obtenerse patrones de difracción de baja resolución de las fibras (Eanes & Glenner, 1968). Los datos obtenidos resultan útiles para estudiar el empaquetamiento de los núcleos resistentes a proteasas, así como la organización general de los agregados. Esta técnica se ha utilizado ampliamente para el estudio de la organización fibrilar de diversos amiloides (Nelson et al., 2005) revelando un motivo estructural denominado *cross- β -sheet* o *spine*, en el que la hojas- β se apilan perpendicularmente al eje longitudinal de la fibra. Los datos obtenidos para la PrP₂₇₋₃₀ muestran un motivo típico de agregados amiloideos similar al empaquetamiento *cross- β* habitual de los amiloideos pero con importantes diferencias (Wille et al., 2009). Otra técnica cristalográfica conocida como cristalografía de electrones y que se utiliza para observar elementos que forman cristales muy pequeños y con organización bidimensional, también ha aportado datos interesantes que derivaron en uno de los primeros modelos estructurales de la PrP^{Sc}, la estructura en hélice- β (Govaerts, Wille, Prusiner, & Cohen, 2004). Finalmente, cabe mencionar otras técnicas por proporcionar información sobre las limitaciones estructurales a nivel

de residuo aminoacídico. La Resonancia paramagnética electrónica (del inglés *Electron Paramagnetic Resonance*, EPR) utiliza elementos paramagnéticos unidos a determinados residuos de la proteína que ofrecen información sobre estructuras locales específicas así como de distancias intra e intermoleculares (Serag, Altenbach, Gingery, Hubbell, & Yeates, 2002). Aplicada a PrP recombinante mal plegada *in vitro*, la EPR mostró una disposición en hoja- β en registro paralela similar a las fibras amiloideas clásicas, pero la ausencia de infectividad de la PrP mal plegada *in vitro* pone en duda la utilidad de dichos datos para la resolución de la estructura de los priones infecciosos (Nathan J. Cobb, Sönnichsen, McHaourab, & Surewicz, 2007). La técnica de intercambio de hidrógeno-deuterio acoplada a la espectrometría de masas (del inglés *Mass-Spectrometry*, MS) o a RMN también informa de las limitaciones estructurales específicas de residuo mediante la medida del grado de accesibilidad de las regiones de la proteína a hidrógenos provenientes del agua, los cuales se intercambian por los deuterios que provienen del agua deuterada. Recientemente, aplicando esta tecnología a priones aislados de cerebro, se ha observado que tienen un núcleo altamente inaccesible al agua compuesto principalmente por hoja- β y pequeños lazos que van desde el residuo 90 aproximadamente hasta el carboxilo terminal. Además, se ha visto que las diferentes cepas de priones muestran diferencias sutiles en la región comprendida entre los residuos 90 y 140 aproximadamente, apuntando a que diferencias conformacionales específicas podrían ser responsables de las diferentes características de las cepas priónicas (Smirnovas et al., 2011).

A partir de todos los esfuerzos realizados para elucidar la estructura de la PrP^{Sc} se establecieron diferentes modelos teóricos explicativos de la misma, en concreto el de hélice- β , el de espiral- β o el de hoja- β en registro (representados en la figura 3).

El modelo de hélice- β (Figura 3A) se basa principalmente en datos obtenidos por microscopía electrónica en cristales bidimensionales que acoplaban perfectamente con una estructura en forma de hélice- β levógira (giro a la izquierda). En este modelo la unidad simétrica básica de la PrP^{Sc} se constituiría por trímeros en los que los residuos amino terminales de la PrP₂₇₋₃₀ (correspondiente a los aminoácidos en ratón del 90 al 175 aproximadamente) forman hélices- β levógiras apiladas horizontalmente con lazos sin estructura definida, compuesto por los residuos de 145 a 163 y en los que los agregados mayores se forman apilando trímeros de la proteína verticalmente a lo largo del eje de la hélice. El extremo amino terminal presentaría un nuevo plegamiento casi completo, de lo contrario, los cambios asociados al extremo carboxilo terminal son menores y prácticamente conservaría la estructura secundaria nativa, salvando el cambio de la primera hélice- α a lazo (Govaerts et al., 2004).

En el caso del modelo espiral- β (Figura 3B), se basa en simulaciones de dinámica molecular de las fluctuaciones conformacionales de la PrP en condiciones amiloidogénicas (pH ácido), utilizando la estructura de la PrP celular como molde de partida. Esta estructura está compuesta de un núcleo espiral de hojas- β compuesto por tres cortas láminas- β (residuos 116-119, 129-132 y 160-164) y una cuarta lámina aislada, residuos aminoacídicos del 135 al 140. En esta simulación

para la estructura protofibrilar del prion, las hojas- β se extienden alternativamente de manera paralela formando láminas en espiral sobre el eje de la fibra. Al igual que en el modelo hélice- β , el mayor cambio conformacional tiene lugar en el extremo amino terminal, mientras que el carboxilo terminal inclusive mantiene las tres hélices- α propias de la PrP^C. Casi todas las observaciones que provienen del uso de técnicas de baja resolución concuerdan bastante bien con este modelo, pero no existe relación posible con lo obtenido a través de proteólisis limitada e intercambio de hidrógeno-deuterio (DeMarco & Daggett, 2004).

Finalmente, otro de los modelos propuestos es el de hoja- β en registro (Figura 3C), el cual es radicalmente distinto a los descritos anteriormente, en el que la PrP se presenta como una pila de hojas- β paralelas que se disponen en registro lo que permite un crecimiento infinito de las fibrillas, es decir, el núcleo amiloide se extiende hasta la región C-terminal de la molécula de modo que esos residuos (160 al 220 aproximadamente) van formando diferentes capas apilables una encima de otra con una disposición en paralelo, quedando las hojas- β alineadas en registro. Se utilizaron las técnicas de intercambio de hidrógeno-deuterio acoplado a MS, además de *site-directed spin labeling* (SDSL) y espectroscopía EPR para estudiar la arquitectura molecular de fibras amiloides formadas por PrP₉₀₋₂₃₁ recombinante humana (Nathan J. Cobb et al., 2007), así como en PrP^{Sc} derivada de encéfalo, particularmente PrP₂₇₋₃₀ aislada de ratones transgénicos que expresan proteína priónica pero sin GPI, evitando posibles interferencias provenientes de los cambios postraduccionales (Smirnovas et al., 2011). Al contrario que en los modelos anteriores, las PrPs que conforman esta estructura consisten en láminas- β y giros y/o lazos relativamente cortos entre ellas, sin hélices- α presentes, lo que indica que la conversión a PrP^{Sc} implica un nuevo plegamiento completo de la PrP^C sin conservación de ninguno de sus motivos estructurales.

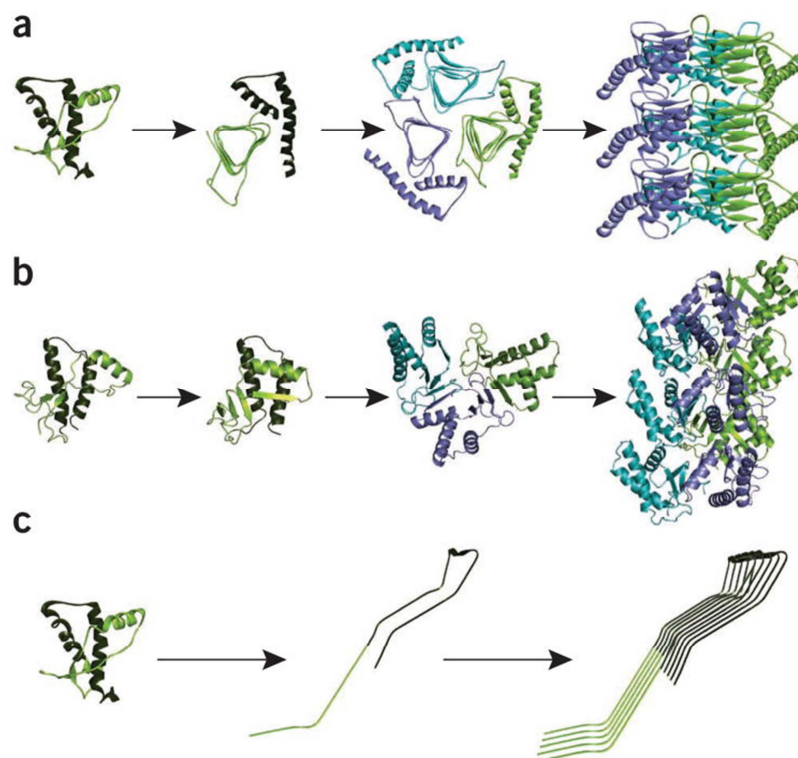


Figura 3. Representación gráfica de distintos modelos de estructura molecular de los agregados de PrP^{Sc}. **A)** Modelo β -helicoidal en que la región N-terminal de la PrP^C sufre un gran cambio conformacional durante la conversión hacia un motivo conocido como hélice- β entre los residuos 90 y 177. La región C-terminal conserva en cambio la organización y estructura α -helicoidal propia de la PrP^C. **B)** Modelo conocido como espiral- β que consiste en un núcleo en espiral de hojas extendidas formadas por hebras- β cortas que abarcan los residuos 116-119, 129-132, 135-140 y 160-164 y en el que las 3 α -hélices características de la PrP^C están altamente conservadas. **C)** Modelo de hoja- β paralela en registro que propone un desplegamiento y re-plegamiento completo de la PrP^C a una estructura compuesta mayoritariamente por hoja- β . (Díaz-Espinoza & Soto, 2012).

La diversidad de los modelos estructurales propuestos refleja claramente el desconocimiento acerca de la estructura tridimensional de la PrP^{Sc}, siendo imposible por ahora determinar cuál se acerca más a la estructura de los priones infecciosos. Sin embargo, estos últimos años, los esfuerzos por esclarecer la estructura de la isoforma infecciosa ha llevado a que el debate se haya reducido a dos modelos principales. El primero de estos modelos más recientes es el denominado PIRIBS (del inglés *Parallel in register β sheets*) (Grovetman et al., 2014). Según los autores, las fibras de PrP^{Sc} están constituidas de un único filamento en que las hojas- β en registro ubicadas de forma paralela, se pliegan perpendicularmente a los ejes de las fibras, de manera que cada monómero de PrP^{Sc} consta de una única capa plana. Cada uno de los monómeros queda apilado en paralelo a lo largo del eje de la fibra.

El segundo, hecho público hace escasamente un año por Vázquez-Fernández y colaboradores se basó en la utilización combinada de la microscopía electrónica de alta resolución y aproximaciones computacionales haciendo uso de la PrP^{Sc} carente de GPI como molécula de estudio (Vázquez-Fernández et al., 2016). Los autores usaron la organización repetitiva intrínseca de las fibras amiloides para analizar la estructura de la PrP₂₇₋₃₀ sin GPI a través de la criomicroscopía electrónica. La media de los segmentos de las fibras analizadas a través de la transformada de Fourier indica una unidad de unos 19.2 Å que se repite (Figura 4). De acuerdo con esta observación, reconstrucciones en 3D demuestran que cada fibra contienen dos protofilamentos diferentes y que el grosor de cada molécula de PrP₂₇₋₃₀ en esas fibras que forman es de aproximadamente 17.7 Å. En conjunto, estos datos indican la existencia de una estructura tipo β -solenoide dispuesta en 4 pisos o peldaños compuestos por unos 36-37 aminoácidos y en el que cada peldaño estaría unido al otro a través de lazos y giros.

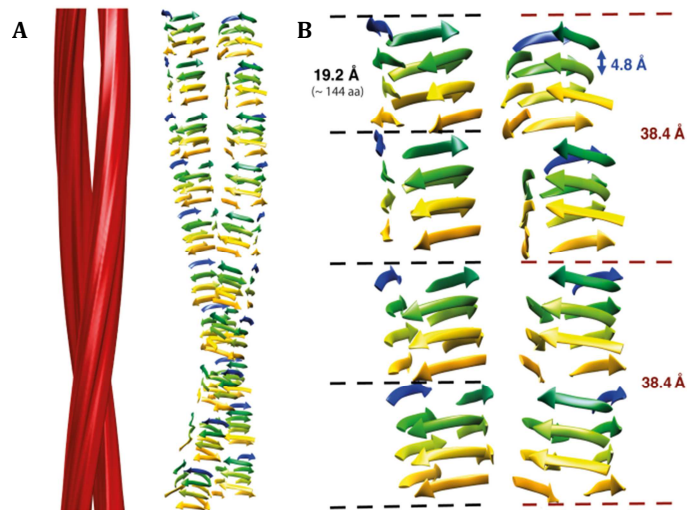


Figura 4. Representación de una fibra de PrP^{Sc} sin GPI y su boceto estructural. A) Reconstrucción en 3D de una fibra de PrP₂₇₋₃₀ carente de GPI con dos protofilamentos (izquierda). Dibujo que representa la posible configuración de las cadenas polipeptídicas formadas por los monómeros de PrP₂₇₋₃₀ (derecha). **B)** Ampliación del posible apilamiento de hojas-β en una estructura β-solenoides apilada en 4 pisos. Los diferentes colores hacen referencia a los diferentes pisos que conforman la estructura. Las distancias características de la estructura se encuentran marcadas. Una fuerte crítica para amoldar la PrP a este tipo de estructura es acomodar el puente disulfuro entre las cisteínas 179 y 214, que se sabe que se conserva en la PrP^{Sc}. (Vázquez-Fernández et al., 2016).

Las diferencias estructurales existentes entre la isoforma patogénica y la isoforma celular les confieren características fisicoquímicas y biológicas que las hacen distinguibles mediante diversas técnicas y que han permitido estudiar determinadas propiedades de la PrP^{Sc}. La PrP^C es monomérica, sensible a proteasas y soluble en detergentes no iónicos; mientras que el mal plegamiento conformacional confiere a la PrP^{Sc} tendencia a la agregación, resistencia parcial a la digestión por proteasas (Cohen & Prusiner, 1998), insolubilidad en detergentes no iónicos (Meyer et al., 1986) y alta resistencia al calor y desnaturalizaciones químicas (Caughey & Chesebro, 2001; Collinge, 2001; Stanley B. Prusiner et al., 1998). La región resistente a PK de la isoforma patogénica es ampliamente utilizada como marcador bioquímico para la detección y caracterización de enfermedades priónicas (Gielbert et al., 2009). El fragmento de unos 12 kDa que es digerido y que corresponde al extremo N-terminal (aproximadamente los aminoácidos del 23 al 90) parece ser prescindible para la conversión, propagación y capacidad infectiva de la PrP^{Sc}, ya que su digestión no afecta a dichas capacidades. Ni siquiera se conoce la naturaleza de los agregados de PrP^{Sc} que interactúan con la PrP^C, ya que las interacciones podrían darse con oligómeros de PrP^{Sc} o con agregados fibrilares mayores. La solubilización de esta PrP^{Sc} en liposomas ha mostrado que su capacidad infectiva queda retenida, lo cual sugiere que los grandes agregados de la isoforma infecciosa no son necesarios para ello y que por consiguiente oligómeros de PrP^{Sc} podrían constituir los verdaderos centros de nucleación para la propagación de los priones (Gabizon et al., 1987). Para evaluar esta relación entre infectividad, capacidad de propagación y tamaño de la PrP^{Sc}, Silveira y colaboradores desagregaron parcialmente PrP^{Sc} fraccionando las especies resultantes de

acuerdo a su tamaño e inoculando las diferentes fracciones en hámsteres, que demostraron un pico de infectividad de las fracciones que contenían partículas de 300-600 kDa (17-27 nm), equivalente a la masa de 14-28 moléculas de PrP (Silveira et al., 2005). Por tanto, parece que los iniciadores más efectivos de EETs no son los grandes agregados amiloideos, que podrían ser en cambio formados como mecanismo protector ante los pequeños oligómeros subfibrilares más peligrosos y secuestrados en las relativamente inocuas placas amiloideas (Adriano Aguzzi & Calella, 2009). La variabilidad del peso de los fragmentos susceptibles a la digestión por PK que presentan distintos aislados de priones se utilizan además para su distinción y clasificación en diversas cepas, lo cual también indica que el plegamiento y la conformación de cada cepa son ligeramente diferentes (Cronier et al., 2008).

Por otro lado, varios estudios han evidenciado la existencia de PrP^{Sc} totalmente sensible a PK (PrP^{Sen}) en determinadas enfermedades priónicas (Gambetti et al., 2003; Pastrana et al., 2006; J. G. Safar et al., 2005). La primera PrP^{Sen} fue descrita por Lasmézas, quien observó enfermedad clínica en ausencia de PrP resistente a PK (PrP^{res}) durante la transmisión de EEB a ratones, los animales inoculados con homogeneizado de cerebro de vaca afectada exhibían signos neurológicos y muerte neuronal; sin embargo, en más del 55% de los ratones no se detectó la presencia de PrP^{res}, aunque apareció al realizar pases seriados una vez que el agente se hubo adaptado al hospedador (Lasmézas et al., 1997). La PrP^{Sen} también se ha descrito en otras enfermedades priónicas, como por ejemplo en ovejas infectadas por *Scrapie* (Thackray, Hopkins, & Bujdoso, 2007). Se cree además, que la PrP^{Sen} puede representar hasta el 90% del total de la isoforma infecciosa en algunos casos de ECJe (ECJ esporádica), a pesar de observarse también PrP^{res} (J. G. Safar et al., 2005). Esta PrP^{Sen} es detectada por inmunoensayos dependientes de conformación, los cuales proporcionan los sitios de unión diferenciales de la proteína priónica después de la desnaturalización (Jiri Safar et al., 1998).

Otras estructuras además de las PrP^{Sc} estudiadas pueden dar lugar a priones infecciosos, complicando la resolución de su estructura 3D, que lejos de ser única, podrían reflejar una diversidad de conformaciones. Ejemplo de ello es la existencia de priones atípicos como aquellos que causan el GSS (P. Parchi et al., 1998; Piccardo et al., 1998; Piccardo et al., 2001; Tagliavini et al., 2001) o la cepa asociada a la prionopatía humana con sensibilidad variable a proteasas (del inglés *Variably protease-sensitive prionopathy*, VPSP) (Gambetti et al., 2008; W. Q. Zou et al., 2010). Otros ejemplos en animales son la cepa de *scrapie* atípico denominada Nor98 que afecta a pequeños rumiantes (Pirisinu et al., 2013) y las cepas L-EEB (Casalone et al., 2004) y H-EEB (Biacabe et al., 2004) en el ganado bovino. Las PrP^{Sc} de las EETs atípicas comparten entre ellas notables características bioquímicas que las distinguen de las PrP^{Sc} de las EETs clásicas. Más concretamente, las cepas de GSS, VPSP y Nor98 se caracterizan principalmente por: 1) altos niveles de PrP^{Sc} sensible a PK pero insoluble, 2) cantidades variables de PrP^{Sc} con alta resistencia a PK, y 3) fragmentos internos de la PrP resistentes a PK carentes parcialmente de los extremos amino y carboxilo de entre 6 y 8 kDa (Pirisinu et al., 2013).

2.2. Mecanismos de conversión a PrP^{Sc}

La conversión de la forma celular de la PrP a la isoforma patógena constituye el evento principal de las enfermedades causadas por priones (K. M. Pan et al., 1993; Shen & Ji, 2011) y, de hecho poder dilucidar completamente el mecanismo de conversión conformacional es uno de los grandes retos de la investigación sobre priones. Según la hipótesis de sólo proteína, la forma endógena normal de PrP, ya sea inducido por PrP^{Sc} exógena o consecuencia de mutaciones asociadas a enfermedades genéticas o mutaciones que podrían incrementar su capacidad de mal plegamiento, sufre un cambio conformacional que la transforma en PrP^{Sc}. La proteína patógena generada es, a su vez, capaz de transformar más moléculas de PrP^C, resultando en una reacción en cadena que lleva a la reducción de los niveles endógenos de PrP^C y al acúmulo de PrP^{Sc} en los tejidos del huésped (Adriano Aguzzi & Calella, 2009).

Con el paso del tiempo fueron surgiendo toda una serie de hipótesis que trataban de explicar los mecanismos que rigen la conversión, atribuyendo de forma generalizada esta transformación a modificaciones químicas postraduccionales. Entre algunas de las propuestas sugeridas se incluyen: la intervención de chaperonas; la propia naturaleza del *holoprion* propuesto por Weissmann (Weissmann, 1991), donde el agente infeccioso constaría de una parte proteica (*apoprion*) y ácido nucleico (*coprion*) o la presencia de algún factor adicional, como la denominada proteína X, como requisito necesario para catalizar el proceso (Cohen & Prusiner, 1998), los autores postulan que la presencia del producto maduro del gen *Prnp* es necesaria, aunque no suficiente, para el proceso de replicación de priones. No obstante, en los últimos años, la necesidad de otros factores además de la PrP para su transformación, se ha puesto en entredicho sobre todo debido al desarrollo de sistemas *cell-free* de propagación de priones *in vitro*.

El sitio exacto en el que ocurre la interacción de la PrP^C con la PrP^{Sc} es incierto aunque análisis de los patrones de distribución en cultivos celulares tanto de la PrP^C como de la PrP^{Sc} han contribuido en la búsqueda de este lugar de conversión. Sin embargo, la deficiente inmunoreactividad de los agregados de la PrP^{Sc} y las dificultades para distinguir inmunológicamente la PrP^C de la PrP^{Sc} han dificultado este objetivo. La mayoría de las evidencias indican que la interacción entre la proteína celular y la exógena patogénica tiene lugar en las balsas lipídicas resistentes a detergentes, donde la PrP^C se encuentra anclada a través de GPI (Caughey & Raymond, 1991), y/o intracelularmente en vesículas endosomales (Caughey, Baron, Chesebro, & Jeffrey, 2009; Caughey & Raymond, 1991; Taraboulos, Raeber, Borchelt, Serban, & Prusiner, 1992). Estos desacuerdos a la hora de establecer o proponer modelos celulares sugieren que la conversión podría ocurrir en diversas localizaciones y a lo largo de diferentes rutas.

Estudios con ratones transgénicos que expresan PrP de hámster junto con la PrP endógena de ratón (S. B. Prusiner et al., 1990) y otros en que se expresaba una PrP soluble y dimérica gracias a su unión a un dominio de inmunoglobulina (Meier et al., 2003), revelaron que la conversión de PrP^C a PrP^{Sc} tiene lugar mediante la formación de un complejo PrP^C/PrP^{Sc}. A pesar de todo, nunca se ha podido aislar o purificar este complejo por lo que se desconoce si en el mismo podría participar algún otro componente (Adriano Aguzzi & Calella, 2009). El primero de los estudios mencionados,

mostró además que la formación del complejo parecía estar favorecida por secuencias aminoacídicas idénticas de la PrP^C y la PrP^{Sc}, respaldando la relación entre la barrera de transmisión interespecies con una mayor dificultad para la formación del complejo PrP^C/PrP^{Sc}. La asociación física entre las dos isoformas de la proteína y, por tanto, la formación de complejo se hizo patente gracias a la generación *in vitro* de moléculas de PrP resistentes a la digestión con PK a partir de PrP^{Sc} y PrP^C purificadas (Kocisko et al., 1994) y a la necesidad de una idéntica secuencia de aminoácidos para la transmisión de la enfermedad dado que las diferencias en la secuencia retrasaban la aparición de la enfermedad priónica prolongando el tiempo de incubación (DeArmond & Prusiner, 1995; M. Scott et al., 1989).

Como puede observarse, el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la propagación de la PrP^{Sc} mediante mal plegamiento de la PrP^C es bastante limitado, aunque se barajan principalmente dos modelos de conversión (figura 5):

Modelo de conversión inducido por molde

Este modelo propone la existencia de una interacción entre la proteína PrP^{Sc} y la PrP^C que induce a la transformación de PrP^C en PrP^{Sc} dado que la isoforma patogénica actúa de molde para ello (figura 5A). En este modelo la conversión espontánea se encuentra desfavorecida debido a la existencia de una alta barrera energética (Cohen & Prusiner, 1998). Para explicar la existencia de las enfermedades priónicas espontáneas o adquiridas, esta teoría propone la existencia de un equilibrio entre la PrP^C y un estado conformacional alternativo denominado PrP*, un intermediario transitorio que participa en la formación de PrP^{Sc}, bien a través de su unión a PrP^{Sc} exógena en el caso de las adquiridas o a través de su interacción con otra molécula de PrP* en el caso de las esporádicas. Respecto a las enfermedades priónicas genéticas, las mutaciones asociadas podrían incrementar la inestabilidad de la PrP^C reduciendo la barrera energética que previene la conversión de PrP^C en PrP^{Sc} o haciendo energéticamente más favorable la interacción PrP^C/PrP^{Sc}, favoreciendo así su agregación (R. Bradley & Wilesmith, 1993). Para que la formación de la PrP* se produzca podría requerirse una unión de la PrP^C a la “proteína X”, un factor adicional y necesario para catalizar el proceso de conversión (K. Abid & Soto, 2006), por lo que la detección de dicho factor supondría un respaldo importante a este modelo. No obstante, la generación de priones recombinantes *in vitro* con componentes altamente definidos y purificados: PrP recombinante, ARNm y lípidos, apuntan a que dicho factor X no es ningún componente proteico específico sino más bien, un componente celular abundante que, sin llegar a formar parte del agente infeccioso, podría actuar como asistente de la conversión (Fei Wang et al., 2010).

Modelo de nucleación-polimerización

En este modelo (figura 5B), la PrP^C y la PrP^{Sc} se encuentran en un equilibrio termodinámico reversible en solución. Ya que la PrP^{Sc} es inestable en su forma monomérica y se estabiliza mediante la agregación con otras moléculas de PrP^{Sc}, el equilibrio termodinámico se desplaza hacia

la formación de la isoforma patógena induciendo por tanto el crecimiento de los agregados (Caughey, Kocisko, Raymond, & Lansbury, 1995). Este desequilibrio termodinámico podría ser causado por mutaciones ligadas a enfermedad que incrementan la tendencia de la PrP^C al mal plegamiento (Apetri, Surewicz, & Surewicz, 2004; Liemann & Glockshuber, 1999; Swietnicki, Petersen, Gambetti, & Surewicz, 1998; Y. Zhang, Swietnicki, Zagorski, Surewicz, & Sönnichsen, 2000).

Este proceso está caracterizado por tener una fase inicial de latencia, en la que tiene lugar la agregación de una manera altamente organizada de varias moléculas de PrP^{Sc} monoméricas para formar un núcleo o una semilla infecciosa. Esta viene seguida de una fase de crecimiento exponencial del polímero atribuible al rápido reclutamiento de nuevas subunidades de PrP^{Sc} en cada extremo de la fibra en expansión, lo que llevaría a la formación de agregados de tipo amiloide y a la estabilización de la semilla. La posterior fragmentación de los agregados incrementaría el número de semillas que a su vez pueden reclutar más PrP^{Sc}, favoreciendo la propagación del agente (Glatzel & Aguzzi, 2001). Esta fase de latencia es crítica en la etapa de nucleación observada en las reacciones de conversión espontánea (N. J. Cobb & Surewicz, 2009), la cual puede ser acortada o incluso desaparecer por la introducción de semillas preformadas (Collinge & Clarke, 2007). Este mecanismo se apoya en modelos matemáticos (Masel & Jansen, 2001; Masel, Jansen, & Nowak, 1999) y en datos cualitativos obtenidos en sistemas de conversión *in vitro* libre de células (Caughey et al., 1995; Masel & Jansen, 2001). Estos últimos demuestran la necesidad de oligómeros mayores que el dímero postulado por el modelo de conversión inducida por molde para propagar la enfermedad (Silveira et al., 2005), así como las caracterizaciones morfológicas de los agregados como polímeros no ramificados y de diámetro relativo constante (Jeffrey, Goodbrand, & Goodsir, 1995; S. B. Prusiner et al., 1983).

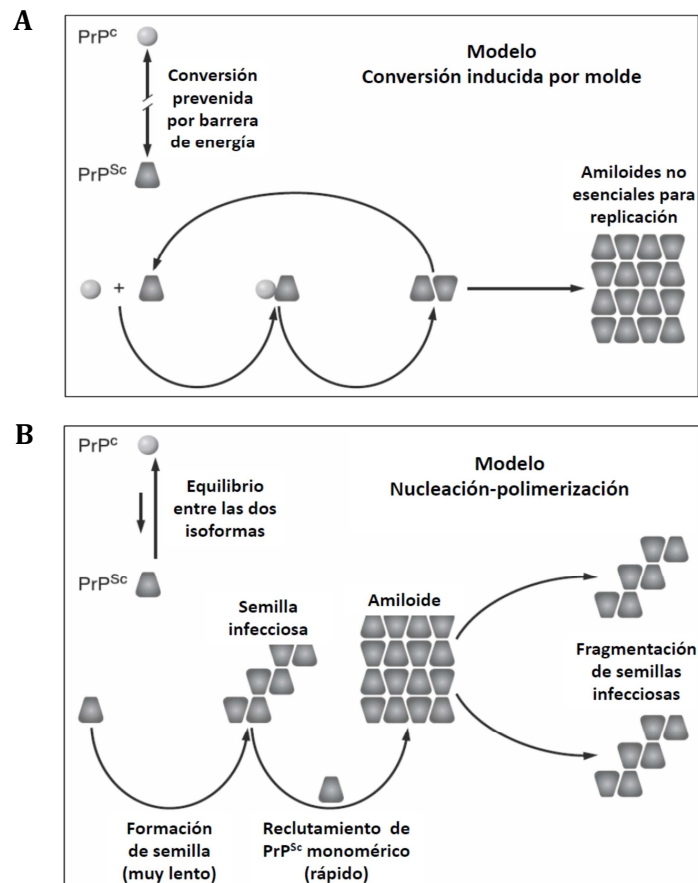


Figura 5. Representación esquemática de los distintos modelos de conversión de priones. A) Modelo de conversión inducida por molde. **B)** Modelo de nucleación-polimerización [Figura adaptada de (Adriano Aguzzi & Calella, 2009)].

2.3. Diseminación de la PrP^{Sc}

El SNC resulta ser el único compartimento del organismo que presenta una degeneración clínica e histopatológicamente detectable en el curso de las enfermedades priónicas (A. Aguzzi, F. Montrasio, & P. S. Kaeser, 2001). Con el fin de reproducir la infección y la replicación del prion, se han realizado varias aproximaciones *in vitro*. Diversas líneas celulares, tanto neuronales como no neuronales (Grassmann, Wolf, Hofmann, Graham, & Vorberg, 2013), así como cultivos organotípicos (Falsig et al., 2012) y neuroesferas (Iwamaru et al., 2013) han sido infectadas de forma eficiente pudiendo mantener el proceso de propagación de priones.

Se han descrito múltiples vías de entrada de priones en el organismo. En casos de adquisición del patógeno por consumo de tejidos o alimentos contaminados como ocurrió con la EEB (Anderson et al., 1996), el *kuru* (Collinge et al., 2006) o la vECJ (Hilton, 2006), el agente infeccioso es capaz de atravesar el epitelio intestinal (concretamente a través de las placas de Peyer) (Andréoletti et al., 2000; Hadlow, Kennedy, & Race, 1982; Van Keulen, Vromans, & Van Zijderveld, 2002) y ser transportado y acumulado en los tejidos linfoides tales como el bazo, los ganglios linfáticos o las amígdalas, entre otros. Además del epitelio intestinal, los priones infecciosos también podrían penetrar la barrera mucosa del estómago a través de otras tres rutas

posibles: absorción a través de células M (Neutra, Frey, & Kraehenbuhl, 1996), vía células dendríticas [la acumulación inicial de priones sobre las células dendríticas foliculares en las placas de Peyer se impide cuando las células dendríticas convencionales se disminuyen transitoriamente durante la exposición oral (C. R. Raymond, Aucouturier, & Mabbott, 2007)], o mediante endocitosis en vesículas cuyo mecanismo es dependiente de ferritina (Mishra et al., 2004). Desde aquí, los priones pueden replicarse y establecerse en el sistema inmune a través de la infección de linfocitos, macrófagos y células dendríticas de los centros germinales, que expresan cantidades considerablemente altas de PrP^C (Adriano Aguzzi & Calella, 2009; Cashman et al., 1990; Kitamoto, Yamaguchi, Doh-ura, & Tateishi, 1991). Más tarde, la PrP^{Sc} asciende retrógradamente a través de las fibras eferentes del sistema nervioso simpático y parasimpático (Beekes, McBride, & Baldauf, 1998; McBride et al., 2001), alcanzando la médula espinal y finalmente el encéfalo (Hoffmann et al., 2007).

Aunque es evidente que los priones son capaces de alcanzar el SNC, aún no se conoce en detalle cómo son transportados a través de los nervios periféricos (Glatzel & Aguzzi, 2000). Basándonos en la hipótesis de “solo proteína”, se podría suponer un mecanismo donde la PrP^{Sc} infiltrada desde el tejido linforeticular iría mal plegando la PrP^C que se encuentre en la superficie de las células del sistema nervioso y así se propagaría secuencialmente hasta alcanzar el SNC. Realmente, este mecanismo es una hipótesis sin fundamento real aunque encaja perfectamente con la extremadamente lenta velocidad de propagación neuronal de los priones (Kimberlin, Hall, & Walker, 1983). Algunas evidencias muestran que mecanismos de transporte axonal y no axonal podrían estar implicados, así como otras células del sistema nervioso central como las células de Schwann (Adriano Aguzzi & Calella, 2009).

Así pues, aunque está claro que el sistema inmunológico forma una parte importante de la patología periférica de las EETs, aún queda por aclarar qué células son las responsables de esa propagación periférica. La participación del sistema inmunológico va más allá en la patología de las enfermedades priónicas adquiridas, puesto que una infección exitosa requiere ser capaz de evadirlo. Probablemente, la respuesta inmunológica está restringida por el hecho de ser una proteína que se expresa de forma endógena aunque mal plegada y posiblemente también porque los epítopos conformacionales deben ser de difícil acceso debido al empaquetamiento y las grandes glicosilaciones de los multímeros de PrP^{Sc} (Kraus, Groveman, & Caughey, 2013). No obstante, una vez que los priones alcanzan el SNC, se da una notable activación de la microglía cuya ablación farmacológica produce un incremento significativo de PrP^{Sc} (Heppner, Arrighi, Kalinke, & Aguzzi, 2001).

Además de esta vía, se han descrito otras formas de neuroinvasión. De hecho, se han reportado varios casos de propagación de priones directamente al cerebro durante procedimientos quirúrgicos (como utilización de derivados hipofisarios, trasplantes de córneas o injertos de duramadre) así como a través de del sistema circulatorio mediante transfusiones sanguíneas de individuos infectados (Barrenetxea, 2012). Por último, otra vía de transmisión de priones mucho menos habitual podría darse a través de aerosoles, los cuales llevan a cabo la invasión de

estructuras neuronales desde las vías respiratorias sin necesidad de una replicación previa del agente en los órganos linfoides (Haybaeck et al., 2011). La difusión de los priones -es decir, la distribución sobre un área del espacio- ya sea de célula a célula, de un tejido a otro o de un individuo a otro, está determinada por su mecanismo de autopropagación acoplado a la habilidad de superar los mecanismos de control de calidad proteica existentes en las células (Deriziotis et al., 2011; Heiseke A, 2010). La difusión de una célula a otra parece ser ayudada o favorecida por la proximidad de las mismas (Kanu et al., 2002; Paquet et al., 2007) y por el anclaje de la PrP^C a la membrana celular externa a través de su GPI (Baron & Caughey, 2003; Speare, Offerdahl, Hasenkrug, Carmody, & Baron, 2010). Estos fenómenos pueden ir asociados a exosomas u otro tipo de vesículas (Fevrier et al., 2004; Magalhães et al., 2005; Vella et al., 2007) o pueden darse a través de nanotubos que forman túneles intercelulares (Gousset et al., 2009).

Finalmente, e independientemente de cómo tenga lugar la neuroinvasión, la diseminación de los priones de hospedador a hospedador, la cual define su transmisibilidad, está bastante bien definida y se encuentra favorecida por la resistencia físico-química que presenta el agente (Kraus et al., 2013). Actualmente se ha detectado presencia de priones en la saliva, la piel (M. C. Garza, Monzon, Marin, Badiola, & Monleon, 2014; Thomzig et al., 2007), la placenta (Andréoletti et al., 2002; María Carmen Garza et al., 2017), glándulas mamarias (Ligios et al., 2005), secreciones nasales y en las heces de animales infectados, por lo que también suponen un elemento de riesgo para la transmisión del prion por vía oral (Gough & Maddison, 2010; Haley et al., 2011; Tamgüney et al., 2012).

2.4. *La diversidad de los priones*

Uno de los fenómenos más fascinantes de la biología de los priones es la existencia de una diversidad de conformaciones de PrP^{Sc} con una misma secuencia aminoacídica. De hecho, este fenómeno es uno de los que más ha cuestionado la hipótesis de “sólo proteína” dado que una misma secuencia de aminoácidos da lugar a distintas cepas de priones capaces de generar distintos fenotipos de enfermedades priónicas cuando son transmitidas a un mismo hospedador. Las distintas características fenotípicas que se observaron por primera vez en 1991 en un mismo hospedador no sólo eran evidentes en cuanto a sintomatología, sino también en relación al patrón de depósitos de proteína agregada, periodo de incubación, perfil de lesiones histopatológicas y áreas de dianas neuronales específicas o tropismo (M. E. Bruce, McConnell, Fraser, & Dickinson, 1991). A la hora de identificar y clasificar las distintas cepas priónicas se toman en consideración propiedades como el periodo de incubación o el perfil de lesiones histopatológicas (M. E. Bruce, 2003). La primera evidencia de la existencia de diferentes cepas priónicas fue observada cuando se inoculó un conjunto de cabras con una mezcla de cerebros procedente de ovejas enfermas de *scrapie*. La transmisión de *scrapie* dio lugar a dos fenotipos clínicamente diferentes, denominados “scratching” y “drowsy” (I. H. Pattison, Gordon, & Millson, 1959; I. H. Pattison & Millson, 1961).

Datos experimentales disponibles hasta el momento proporcionan claras evidencias de que las cepas priónicas están codificadas por una variedad de conformaciones que la PrP^{Sc} puede adoptar, las cuales pueden afectar a sus propiedades biológicas y bioquímicas. Es decir, la especificidad de las cepas parece estar determinada por la estructura terciaria y/o cuaternaria de la proteína priónica, lo cual va acorde con la hipótesis de “sólo proteína”. Estas diferencias moleculares podrían ser las causantes de la diversidad de signos clínicos que muestran las enfermedades priónicas.

La primera evidencia de que diferencias morfológicas podrían determinar la diversidad de propiedades biológicas de las cepas priónicas procede de un estudio en el cual fibras de PrP^{Sc} de ratones y hámsteres infectados con *scrapie* (denominadas ME7 y 139A en ratón y 263K en hámster) fueron aisladas y sus propiedades comparadas (Kascsak et al., 1985). ME7 y 139A poseían morfología y sensibilidad a la digestión con PK diferentes respecto a la 263K de hámster, a pesar de tener un origen común. En otro estudio, se observó la emergencia de dos cepas distintas (denominadas Hyper y Drowsy), tras la inoculación en hámsteres de un aislado de ETV dando lugar a dos fenotipos completamente diferentes a pesar de su origen y hospedador común. Durante la purificación de la PrP^{Sc} acumulada en los encéfalos de estos hámsteres infectados, se observaron ciertas diferencias en propiedades de sedimentación movilidad electroforética, inmunoreactividad en su región N-terminal, resistencia al tratamiento con desnaturalizantes y sensibilidad al tratamiento con PK (Bessen & Marsh, 1992a, 1992b, 1994). Estos hallazgos indicaron que, aunque originariamente las cepas proceden del mismo hospedador, las moléculas de PrP^{Sc} de cepas priónicas diferentes varían en su conformación y/o composición. A día de hoy, dado el desconocimiento de las estructuras terciaria y cuaternaria de la PrP^{Sc}, resulta imposible determinar en qué consisten dichas diferencias estructurales y cómo determinan las diferencias fenotípicas entre cepas. Otro aspecto destacable y relacionado con el concepto de cepa es el fenómeno de “memoria” (M. Bruce et al., 1994), referido al hecho de que una determinada cepa pueda ser aislada nuevamente en la especie de origen, tras haber sido transmitida a una especie intermedia con distinta secuencia de PrP.

Por otro lado, la investigación con levaduras ha proporcionado información esencial para entender el fenómeno de cepa. A modo de ejemplo, el grupo del Weissman y Cullin mostraron la existencia de una correlación directa entre la estabilidad de las fibras de Sup35 procedentes de levaduras y su capacidad propagativa (Immel et al., 2007; Tanaka, Collins, Toyama, & Weissman, 2006; Tanaka, Chien, Naber, Cooke, & Weissman, 2004). Un ensayo de estabilidad conformacional de 30 aislados priónicos diferentes demostró una relación lineal entre las concentraciones de cloruro de guanidinio que se necesita para desnaturalizar el 50% de las moléculas de PrP^{Sc} y el tiempo de incubación. Esta nueva información sugirió que la baja estabilidad de la PrP^{Sc} favorece la fragmentación de las moléculas de la PrP^{Sc}, de este modo, podría aumentar el número de núcleos de agregación acelerando la formación de PrP^{Sc} lo que conllevaría tiempos de incubación más cortos (Legname et al., 2006).

Además del tiempo de incubación, la estabilidad priónica se ha asociado también con la habilidad relativa de las distintas cepas de priones a la hora de invadir el SNC (Bett, Joshi-Barr, et al., 2012). De esta forma, las cepas priónicas altamente neuroinvasivas parecen ser más inestables conformacionalmente cuando se encuentran en condiciones desnaturalizantes y de forma eficiente forman agregados difusos de PrP, no agregados fibrilares, lo que produce una progresión rápida de la enfermedad en ratones. Por otra parte, las cepas con una menor capacidad de neuroinvasión serían aquellas que forman placas densas, con alta afinidad al rojo congo, y fibrilares, siendo el progreso de la enfermedad más lento.

Las proporciones relativas de las formas diglicosilada, monoglicosilada y no glicosilada de la PrP^{Sc} varían entre las cepas de priones y se mantienen estables durante inoculaciones seriadas en animales (Collinge et al., 1996; R. E. Race et al., 2002) y también durante la propagación de priones *in vitro* (Castilla, Morales, et al., 2008). Esto parece sugerir que las cepas de prion podrían estar supeditadas a una combinación de la conformación de la PrP y de su patrón de glicosilación. En algunos casos, estas propiedades suelen mantenerse de forma robusta con lo que pueden ser utilizadas para clasificar y distinguir determinadas cepas de prion. No obstante, el descubrimiento de priones que no presentan el patrón de tres bandas característico tras la digestión con PK ha hecho que se distingan dos grandes grupos de cepas priónicas. Primeramente tenemos las clásicas, que presentan el patrón de tres bandas con diferentes proporciones según la cepa; y en segundo lugar las atípicas, que además de poder presentar las tres bandas, que en la mayoría de los casos no suelen estar muy bien definidas, se caracterizan por mostrar fragmentos internos de la PrP resistentes a PK y escindidos en los extremos amino y carboxilo de entre 6 y 8 kDa según la cepa. Algunos ejemplo de cepas atípicas que han sido encontradas son: diferentes cepas causantes del síndrome de GSS (P. Parchi et al., 1998; Piccardo et al., 1998; Piccardo et al., 2001; Tagliavini et al., 2001), la cepa causante de la VPSPr (Gambetti et al., 2008; W. Q. Zou et al., 2010) en humanos y la cepa de *scrapie* atípico llamada Nor98 que afecta a pequeños rumiantes (Pirisinu et al., 2013). Sin embargo, en el caso de los bovinos se han detectado otras cepas que presentan un patrón tribanda sólo distinguibles por su particular movilidad electroforética (Balkema-Buschmann et al., 2011) y denominadas atípicas no por presentar un patrón atípico sino por ser minoritarias respecto a la EEB clásica.

El fenómeno de tropismo celular es una de las características más llamativas de las cepas priónicas, esto es, la capacidad selectiva que presentan las cepas a la hora de invadir y colonizar las diferentes regiones del cerebro, mostrando dianas neuronales específicas que llevan a distintos signos clínicos y patrón de deposición de PrP^{Sc} en el cerebro. A pesar de que el fenómeno de tropismo ha sido ampliamente estudiado en una gran variedad de líneas celulares capaces de propagar distintas cepas de priones, aún se desconoce qué es lo que define este tropismo celular en cada una de las cepas de priones (S. P. Mahal et al., 2007). Se ha propuesto que el comportamiento de cepa podría estar definido por la estructura supramolecular del prion. Esta influiría en su habilidad de unirse o interactuar con moléculas específicas, como por ejemplo distintos

receptores celulares, y por tanto, su capacidad de propagación sería dependiente de un tipo celular específico (Adriano Aguzzi & Calella, 2009). Este postulado implicaría que el tropismo celular de las cepas de priones estaría controlado por la existencia de cofactores celulares específicos, ya sean chaperonas, receptores específicos de captación, especies de ARN, entorno lipídico característico, molécula de PrP modificada de una manera post-transduccional específica o un entorno subcelular particular. Esta hipótesis se basaría en la existencia de cofactores específicos potencialmente existentes en cada tipo celular y necesarios para la conversión de ciertas cepas priónicas (A. Aguzzi, Heikenwalder, & Polymenidou, 2007). Este hecho se observaría también *in vitro* cuando se utiliza el dextrano sulfatado como cofactor permitiendo la propagación selectiva de una determinada variante conformacional (Fernández-Borges, Di Bari, et al., 2017). Por otra parte, otras teorías apoyan que debido a que el proceso de glicosilación difiere entre los distintos tipos celulares, el patrón de glicosilación de la PrP^{Sc} podría actuar como conductor de la misma hacia una región determinada del SNC (Collinge et al., 1996). De esta forma, se evidencia que las glicofomas concretas de PrP^{Sc} podrían propagarse de forma más eficiente en poblaciones neuronales que expresan una glicofoma similar de PrP^C en la superficie celular (Collinge, 2001).

De forma general y teniendo en cuenta todo lo anteriormente comentado, las cepas priónicas puede caracterizarse de acuerdo a una serie de diferentes parámetros:

-Propiedades biológicas. Las diferentes cepas provocan diferentes fenotipos de enfermedad que son identificados por sus periodos de incubación, signos clínicos y alteraciones histopatológicas tales como distribución de la PrP^{Sc}, perfiles de lesiones (espongiosis) y tropismo celular y de tejidos.

-Propiedades bioquímicas. Cada cepa de prion presenta un conjunto específico de características bioquímicas. Entre otros, pueden diferir en su estabilidad frente a agentes desnaturalizantes, patrón de glicosilación y movilidad electroforética después de la digestión con PK y en su relativa resistencia a la degradación proteolítica. Además, también se han descrito diferencias entre cepas referente a sus afinidades por la unión a metales (WadsworthJonathan et al., 1999), es el caso de dos tipos diferentes de PrP^{Sc} humanas, vistas clínicamente como subtipos diferentes de la clásica ECJ, pueden ser interconvertidas *in vitro* alterando los sitios que ocupan los metales. La dependencia conformacional de PrP^{Sc} sobre la unión a cobre y zinc representa un nuevo mecanismo para modificaciones postraduccionales de la PrP y, por tanto para la generación de variabilidad de cepas.

-Propiedades conformacionales. Distintas cepas de priones pueden tener patrones de resistencia a proteasa similares pero pueden distinguirse por sus conformaciones. Las diferencias conformacionales de las cepas pueden demostrarse por técnicas de sedimentación (Bessen & Marsh, 1992a), dispersión de luz (Scheibel & Lindquist, 2001), tanto como por microscopía electrónica de transmisión como de fuerza atómica (Serio et al., 2000), a través de estudios basados en cambios estructurales, por difracción circular

(Jiri Safar et al., 1998) y a través del mapeo de epítomos (inmunoensayo dependiente de la conformación) (W.-Q. Zou et al., 2003).

3. Barrera de transmisión.

La transmisión de enfermedades priónicas entre diferentes especies de mamífero, aunque es factible, puede verse restringida por el fenómeno denominado barrera de transmisión o barrera de especie. La existencia de dicha barrera de transmisión se traduce en una prolongación de los tiempos de incubación y/o una tasa de ataque incompleta, es decir, en que no todos los animales inoculados desarrollan la enfermedad (Dickinson, 1976) cuando se transmiten de una especie a otra. Habitualmente, durante una primera infección interespecífica de priones, no todos los animales infectados sucumben a la enfermedad y, en caso de hacerlo, se observan tiempos de incubación más prolongados y variables que cuando la transmisión tiene lugar dentro de la misma especie, donde todos los animales sucumben transcurrido un periodo de incubación relativamente corto y similar. Los tiempos de incubación se van reduciendo a lo largo de pases o transmisiones sucesivas en la nueva especie hasta que finalmente se estabilizan, siendo posible cuantificar de cierta forma el grado de barrera existente entre las dos especies (donadora y aceptora) midiendo la reducción del tiempo de incubación que se da entre el primer y segundo pase. No obstante, la forma más rigurosa de llevar a cabo una cuantificación de la barrera existente es a través de estudios comparativos de titulación, en los que los animales de la especie donante y de la especie receptora son inoculados con diluciones seriadas del inóculo priónico comparándose de esta forma la Dosis letal 50 (del inglés *Lethal dose 50 %*, LD50) media de cada especie. De hecho, el efecto de una barrera de especies (por ejemplo, la existente entre ratón y hámster) es que pocos animales, si los hay, sucumben a la enfermedad en un primer pase alcanzando periodos de incubación próximos a la esperanza de vida de la especie en cuestión (Collinge, 2001). Así, ratones inoculados con PrP^{Sc} de hámster desarrollan la enfermedad tras 500 días post-inoculación, tiempo que se reduce a 130 días si se trata de PrP^{Sc} murina. Sin embargo, en pases posteriores seriados dentro de la misma especie se observa una reducción del periodo de incubación, hasta que finalmente se adapta a la nueva especie, como sucede con el patrón de lesión y otras propiedades neuropatológicas (M. E. Bruce, 2003).

Los primeros estudios sobre las bases moleculares de la barrera de transmisión apuntaban a que podría deberse a un efecto acumulativo de factores tales como la eficiencia de conversión y la patología causada por la cepa seleccionada (Kimberlin, Cole, & Walker, 1987; Kimberlin, Walker, & Fraser, 1989). Posteriormente, se argumentó que esta barrera residía principalmente en las diferencias existentes en la estructura primaria de la PrP entre la especie de la que procedía el inóculo y la especie hospedadora (S. B. Prusiner et al., 1990; M. Scott et al., 1989; M. Scott et al., 1993). Varios estudios han corroborado esta teoría, entre los que cabe mencionar el uso de ratones transgénicos que expresaban las PrP de hámster junto con la endógena murina, donde la infección con una cepa de hámster daba lugar a la formación de PrP^{Sc} compuesta mayoritariamente por PrP de hámster mientras que la inoculación con una cepa murina, daba lugar a agregados compuestos

por PrP de ratón (S. B. Prusiner et al., 1990). La importancia de la similitud de las secuencias de PrP en la determinación de las barreras de transmisión queda patente cuando una misma especie presenta variantes polimórficas de PrP. Este es el caso de la diferente susceptibilidad de los ratones de genotipo *a* y genotipo *b*, cuyas PrPs difieren en dos residuos aminoacídicos y muestran tiempo de incubación muy dispares en función de la cepa priónica inoculada (Carlson et al., 1988), o los diversos polimorfismos que aparecen en las PrPs ovinas y que determinan su mayor o menor susceptibilidad a la infección por *scrapie* (Laude et al., 2002). De igual forma, el hecho de que la ECJ esporádica y adquirida se dé principalmente en individuos homocigotos para el polimorfismo del residuo 129 (M129M) de la PrP, apoya la idea de que el proceso de propagación de priones es más eficiente cuando la PrP^{Sc} y la PrP^C que interactúan poseen idéntica estructura primaria (Collinge, 2001; Collinge, Palmer, & Dryden, 1991; Palmer, Dryden, Hughes, & Collinge, 1991); es más, experimentos con ratones transgénicos han mostrado que el polimorfismo V129 actúa como barrera de transmisión para el agente EEB y produce alteraciones en el fenotipo de la enfermedad (Wadsworth et al., 2004). No obstante, la relación entre similitud de secuencias primarias entre PrP^{Sc} y PrP^C y el grado de barrera de transmisión no es directa, ya que la sustitución de determinados residuos aminoacídicos puede tanto ejercer un efecto insignificante en la capacidad de transmitir como, por el contrario, llegar a prevenir la transmisión de la enfermedad o al menos su desarrollo a lo largo de la vida del animal infectado (Priola & Chesebro, 1995). Los cambios aminoacídicos relevantes en la barrera de transmisión pueden darse a lo largo de toda la secuencia de la PrP, pero no todos ellos influyen de la misma forma en la eficiencia de transmisión. La cantidad de aminoácidos coincidentes entre inóculo y sustrato de la región central de la PrP tienen generalmente mayor efecto sobre la eficiencia del proceso de conversión (M. Scott et al., 1993; M. R. Scott, Kohler, Foster, & Prusiner, 1992; Glenn C. Telling et al., 1995). Sobre todo, la región del denominado lazo rígido que separa la segunda hélice- α de la segunda lámina- β (residuos del 165 al 175 en la proteína priónica del ratón) ha sido establecida como zona crítica en la estructura de la PrP^C dado que cambios mínimos en su secuencia aminoacídica influyen significativamente en la susceptibilidad del ratón a *scrapie*, EEB, *scrapie* adaptada a ratón, EDC (del inglés *Chronic wasting disease*, enfermedad debilitante crónica) y *scrapie* adaptada a hámsteres (Bett, Fernández-Borges, et al., 2012; Sigurdson et al., 2011; Sigurdson et al., 2010).

Sin embargo, las diferencias aminoacídicas entre PrPs de donante y receptor no son el único determinante de las barreras de transmisión. En estudios relacionados con enfermedades priónicas humanas se comprobó que la transmisión de la ECJ esporádica a ratones es muy ineficiente (Collinge et al., 1995; A. F. Hill et al., 1997). Por el contrario, y a pesar de que posee la misma secuencia de PrP que la ECJ esporádica, la vECJ se transmite fácilmente en ratones salvajes (A. F. Hill et al., 1997). También puede darse el caso de que una determinada cepa se transmita con relativa facilidad a otras especies; este comportamiento fue observado en la cepa responsable de la encefalopatía espongiforme bovina. Esta cepa es muy promiscua y se transmite muy eficientemente a un rango amplio de especies, siendo capaz de mantener sus características biológicas al pasar a especies intermediarias y con distinta secuencia de la PrP (M. Bruce et al., 1994). A raíz de estos

hallazgos y dado a que dos cepas con la misma secuencia de aminoácidos y propagadas en el mismo hospedador pueden sufrir barreras completamente diferentes, empezó a favorecerse el uso del término “barrera de transmisión” frente al de “barrera de especies” (Collinge, 1999; Collinge & Clarke, 2007).

Recientemente, la PrP^C del topillo rojo ha sido propuesta como la proteína aceptora universal de priones (Watts et al., 2014) desde que ratones transgénicos sobreexpresando la PrP^C de esta especie son susceptibles a una amplia variedad de aislados priónicos procedentes de diferentes especies, entre los que se encuentran priones humanos, oveja, hámster, ratón, alce y cobayas, entre otras. Este excepcional promiscuidad de los ratones transgénicos que expresan la PrP del topillo rojo indica además que solo un pequeño número de aminoácidos diferentes en la PrP influye en la eficiencia de conversión de priones.

Sin lugar a dudas, una de las técnicas que más luz ha arrojado al estudio de las barreras de transmisión ha sido la PMCA; esta replica la propagación de priones que podría suceder *in vivo*, manteniendo las propiedades de cepa y por ello resulta una herramienta de gran utilidad para el estudio del fenómeno de las barreras de transmisión (Fernandez-Borges, de Castro, & Castilla, 2009). La correlación existente entre lo que sucede *in vivo* y lo que ocurre *in vitro* haciendo uso de la PMCA ha sido demostrada en diversas ocasiones, un ejemplo de ello es el de las cepas generadas en PrP de cérvido a partir del mismo prion murino, denominado RML (del inglés *Rocky Mountain Laboratory*), mediante PMCA e *in vivo*, que muestran propiedades idénticas al ser inoculados en animales (Green et al., 2008). De esta forma, la PMCA permite la utilización de una amplia variedad de cepas de priones para evaluar diversas PrP polimórficas y sus barreras de transmisión, las cuales son costosas de evaluar *in vivo* (Fernandez-Borges et al., 2009). Como ejemplo más claro de la utilización de la PMCA para el estudio de este fenómeno es el realizado con priones de ratón y hámster, dos de los modelos más utilizados para el estudio de las enfermedades priónicas. A través de PMCA, se consiguió adaptar un prion de hámster a ratón en 2 o 3 semanas, lo que *in vivo* requirió al menos de 3 o 4 pases seriados de inoculación (tiempos de incubación medios de 150-200 días desde su inoculación por cada pase), lo que demostró que la PMCA permite cruzar barreras de transmisión existentes *in vivo* con una cinética acelerada (Castilla, Gonzalez-Romero, et al., 2008). No obstante, la relativa facilidad con la que pueden superarse algunas barreras de transmisión *in vitro* supone una desventaja. Esto se observa cuando algunas barreras infranqueables en experimentación *in vivo*, ni siquiera con animales transgénicos con sobre expresión de PrP (Sigurdson et al., 2006) han sido superadas con la utilización de la PMCA. Por tanto, los resultados obtenidos con este sistema deben evaluarse con cautela y no pueden ser extrapolados directamente a la situación que podría darse *in vivo*. No obstante, esta limitación puede resolverse, al menos en parte, estableciendo parámetros controlados empíricamente respecto a un estándar y evitando la conversión de prácticamente cualquier PrP^C.

Indudablemente el fenómeno de barrera de transmisión resulta de vital importancia para valorar el riesgo de infección entre especies y sus implicaciones en salud pública y animal. Al

respecto, un estudio de Espinosa y colaboradores en ratones transgénicos que expresan la PrP bovina, pone de manifiesto que el agente causal de la EEB sufre una serie de alteraciones al traspasar la barrera de especie que supone la infección en ganado ovino, que afectan a sus propiedades patológicas y redundan en un incremento de virulencia con respecto a la EEB. El incremento de virulencia en este prion emergente de EEB pasado por oveja implica un riesgo evidente de transmisibilidad potencial que atañe a otras especies, incluyendo al humano (Espinosa et al., 2007). No obstante, la determinación y cuantificación de una barrera de transmisión es posible cuando se tienen datos sobre su transmisibilidad, es decir, si se conoce su transmisibilidad *in vivo*; cuando lo realmente útil sería un método de predicción del grado de barrera de transmisión existente entre una especie y otra para evaluar la posibilidad de nuevas epidemias de origen zoonótico. Una herramienta inexistente actualmente debido a que no se conoce en detalle qué determina el grado de la barrera de transmisión entre especies.

4. Generación y propagación *in vitro* de priones.

Uno de los mayores avances y de mayor importancia en el campo de la investigación con priones ha sido la obtención de sistemas capaces de mimetizar *in vitro* de una forma eficiente y fidedigna el proceso de conversión que tiene lugar *in vivo* en animales y humanos afectados de EETs. A lo largo de estos años, con la finalidad de estudiar en detalle la naturaleza del agente infeccioso se han desarrollado varios sistemas *in vitro* distintos que imitan el proceso de conversión contribuyendo a una reducción notoria tanto del coste como del tiempo de incubación que se derivan de la experimentación *in vivo* en modelos animales.

Los tres sistemas más utilizados son: el ensayo de conversión libre de células, la conversión inducida por agitación o QuIC (QUaking Induced Conversion) y la técnica utilizada a lo largo de toda esta tesis, la PMCA.

4.1. Ensayo de conversión libre de células

El primer sistema descrito que mimetiza el proceso de conversión de PrP^C a PrP^{Sc} fue desarrollado por el grupo de Byron Caughey. Este sistema se basa en el uso de las isoformas purificadas: PrP^C y PrP^{Sc}. Tras desnaturalizar la PrP^{Sc} mediante el uso de agentes caotrópicos se permitió su renaturalización por medio de una dilución del agente desnaturalizante. Se observó que la PrP^{Sc} renaturalizada era capaz de inducir el cambio conformacional de la PrP^C en condiciones ligeramente desnaturalizantes que previamente había sido marcada con radiactividad con el fin de facilitar su detección (Kocisko et al., 1994).

El desarrollo de este sistema ha permitido la identificación de factores que afectan al proceso de conversión, así como al entendimiento de la barrera de transmisión (G. J. Raymond et al., 2000). Sin embargo, la mayor aportación de este sistema de propagación ha sido la demostración de que la PrP^{Sc} es capaz de transformar PrP^C a una isoforma anómala sin la interacción de ningún otro componente, tal como predice la hipótesis de “sólo proteína”. No obstante, el bajo rendimiento

de la conversión observada junto con las condiciones no fisiológicas empleadas durante el proceso de conversión y el exceso de PrP^{Sc} necesaria para iniciar la propagación, han dificultado mucho la evaluación de la infectividad de la proteína generada *in vitro*.

4.2. Conversión inducida por agitación o QuIC

El método QuIC fue desarrollado en 2008 por el grupo de Byron Caughey (Atarashi et al., 2008), convirtiéndose en uno de los métodos más populares para el mal plegamiento de priones *in vitro*. Es una técnica de detección ultrasensible que presenta una sensibilidad del 96% y una eficacia del 100% cuando se utiliza para detectar PrP^{Sc} proveniente de líquido cerebroespinal de pacientes portadores de ECJ (Orrú, Groveman, Hughson, et al., 2015). El método se basa en la conversión de una PrP recombinante (recPrP) usando PrP^{Sc} como inductor de la formación de agregados amiloides (Atarashi, Sano, Satoh, & Nishida, 2011). Mediante ciclos de agitación vigorosa e incubación se favorece la formación de agregados cuya detección puede monitorizarse en tiempo real a través de fluorescencia utilizando un compuesto con afinidad por proteínas ricas en lámina β, la Tioflavina T (del inglés *Thioflavine T*, ThT). La agitación, un factor importante en este ensayo, promueve la fragmentación de las fibrillas amiloides, formando así más semillas reactivas. Estas semillas nuevas que se forman reclutan más proteínas recombinantes provenientes del sustrato, induciendo más conversión y dando lugar a un incremento exponencial en la formación de amiloides.

Desde el desarrollo del QuIC a tiempo real, sus aplicaciones han sido expandidas a varias áreas de la investigación de priones incluyendo el diagnóstico de enfermedades priónicas tanto humanas (Atarashi, Satoh, et al., 2011; Orrú et al., 2014) como animales (Haley et al., 2016; Levavasseur et al., 2017), diferenciación de cepas priónicas (Levavasseur et al., 2017; Orrú, Groveman, Raymond, et al., 2015) y ensayos de titulación de la infectividad priónica (Henderson et al., 2015; Wilham et al., 2010).

4.3. Amplificación cíclica de proteínas mal plegadas (PMCA)

En un intento de mejorar el sistema de conversión libre de células (Kocisko et al., 1994), en el año 2000 se realizó la primera transformación de PrP^C a PrP^{Sc} partiendo de cantidades ínfimas de esta última mediante el uso de la sonicación (Saborio, Permanne, & Soto, 2001). Este estudio dio lugar al inicio de la técnica de amplificación cíclica de proteínas mal plegadas o PMCA (del inglés *Protein Misfolding Cyclic Amplification*). Dos elementos fueron claves para el desarrollo de esta técnica: i) el sistema previo del grupo de Caughey que demostró la capacidad de replicación de una proteína por sí misma en un tubo de laboratorio (Kocisko et al., 1994) y ii) un sistema cíclico basado en un baño de ultrasonidos/incubación que facilitó el proceso (Saborio et al., 2001). Conceptualmente, la PMCA es análoga de la amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (del inglés *polymerase chain reaction*) donde un molde crece a expensas de un sustrato en una reacción cíclica.

Aunque la PMCA inicialmente fue desarrollada para realizarse manualmente, pronto fue automatizada con el fin de aumentar su sensibilidad, especificidad y rendimiento (Castilla, Saa, Hetz, et al., 2005; Castilla et al., 2006; Saa, Castilla, & Soto, 2005, 2006b). La técnica, representada en la figura 6, se basa en un proceso cíclico que permite una replicación acelerada de priones *in vitro*, en el cual cada ciclo se compone de dos fases. Durante la primera fase, la muestra que contiene pequeñas cantidades de PrP^{Sc} que actúa de molde es incubada en presencia de un gran exceso de PrP^C, el sustrato de la reacción, lo a expensas del cual se forman nuevos agregados de PrP^{Sc}. Tras esta fase de incubación, las muestras se someten a la acción de ultrasonidos con el fin de romper los agregados de PrP^{Sc}, multiplicando así el número de núcleos de crecimiento para la continua conversión posterior. Con cada ciclo sucesivo, se produce un aumento exponencial de núcleos de agregación acelerándose el proceso de conversión exponencialmente (Saa et al., 2005). De esta manera, tras varios ciclos de incubación-sonicación se incrementan significativamente los niveles de priones en la muestra desde valores indetectables hasta niveles fácilmente detectables mediante técnicas bioquímicas (Saborio et al., 2001).

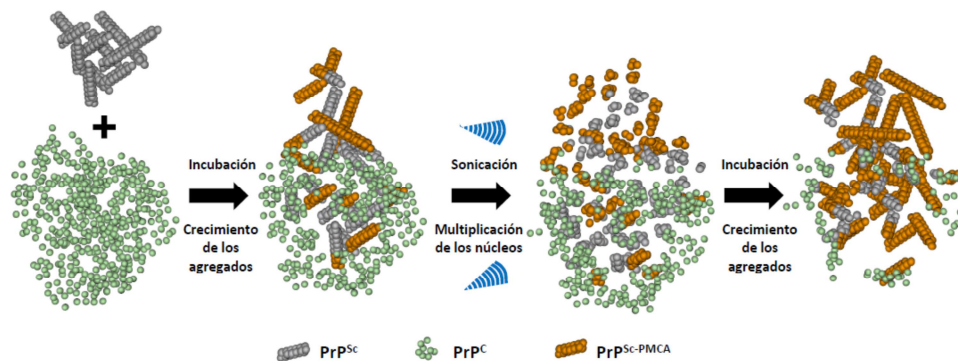


Figura 6. Representación esquemática de un ciclo de PMCA. Están representadas las dos fases que comprenden un ciclo de PMCA: 1) fase de crecimiento de los agregados; y 2) fase de multiplicación de los núcleos de agregación.

La técnica de PMCA ha sido modificada y adaptada varias veces desde su creación: nuevas ideas, equipos más sofisticados y nuevas aplicaciones han sido elementos esenciales para su actualización. Sin embargo, el proceso molecular que tiene lugar durante la replicación de priones *in vitro*, aún se desconoce. Se ha sugerido que la primera fase de latencia basada en la nucleación inicial podría ser el evento más importante para obtener un buen nivel de amplificación. La nucleación es un proceso muy susceptible que puede ser inhibido o alterado por distintos factores físico-químicos: semillas homólogas o heterólogas, temperatura, concentración de PrP o inhibidores de nucleación entre otros.

La PMCA ha demostrado ser un método eficaz *in vitro* al mimetizar algunos de los pasos fundamentales implicados en la replicación de priones *in vivo*. Se trata de una técnica de gran utilidad para replicar de manera eficiente una variedad de cepas de priones infecciosas en distintas especies manteniendo las características de dicha cepa (Castilla, Morales, et al., 2008). Esta técnica también es capaz de mimetizar gran parte de los fenómenos de barrera de transmisión y adaptación característicos de muchas cepas de prion (Castilla, Gonzalez-Romero, et al., 2008). Sin

embargo, no podemos olvidar que la PMCA nació fundamentalmente para mejorar el diagnóstico de las EETs y, por ello, ha sido utilizada para la detección de priones en la mayoría de los tejidos y fluidos corporales. A modo de ejemplo, esta metodología se utilizó para detectar por primera vez priones en sangre proveniente de animales tanto sintomáticos como presintomáticos (Castilla, Saa, & Soto, 2005; Saa, Castilla, & Soto, 2006a).

Por otro lado, esta técnica también permitió confirmar algunos de los postulados centrales de la hipótesis de “sólo proteína”. De esta forma se observó como la conversión PrP^C-PrP^{Sc} tenía lugar de forma cíclica y que la nueva PrP^{Sc} generada era capaz de propagar el cambio de conformación a otras PrP^C (C. Soto, Saborio, & Anderes, 2002). En la última década, la replicación *in vitro* de priones ha sido decisiva para confirmar esta hipótesis, fundamentalmente gracias a la generación de priones infecciosos mediante el uso de sustratos basados exclusivamente en PrP recombinante (J. I. Kim et al., 2010).

Todos estos logros de la PMCA añadidos a su capacidad para generar nuevos priones (*de novo*) *in vitro* (Castilla, Gonzalez-Romero, et al., 2008; Chianini et al., 2012), así como su uso para la evaluación de los riesgos potenciales de transmisión de diferentes cepas de priones en seres humanos y animales, hacen que esta técnica esté siendo una de las herramientas más importantes de la última década en el campo de los priones.

4.3.1. El uso de PrP recombinante en PMCA

En los últimos años se han realizado diferentes estudios con el objetivo de generar priones sintéticos infecciosos mediante el uso de recPrP. Esta proteína al generarse a través de su expresión en bacterias presenta dos diferencias importantes a tener en cuenta en los estudios de propagación *in vitro* y de infectividad *in vivo*: i) carece de glicosilación y ii) carece de la secuencia C-terminal hidrofóbica que sirve de anclaje al GPI. A pesar de las diferencias que presenta esta proteína de origen bacteriano comparada con la proteína expresada en células eucariotas, su utilización en la técnica de PMCA ha permitido la generación de priones infecciosos sintéticos. De tal forma que Kim y colaboradores mediante el uso de semillas de PrP^{Sc} generaron priones infecciosos utilizando sustratos basados exclusivamente en PrP recombinante sin la necesidad de ningún otro cofactor. Aunque su infectividad fue limitada, únicamente utilizaron sales y detergentes además de la recPrP (J. I. Kim et al., 2010). La definición de infectividad limitada responde a que no todas las PrP recombinantes mal plegadas *in vitro* en una isoforma resistente a PK, resultan tan infecciosas como las semillas de origen cuando se inoculan *in vivo*, siendo gran parte de estas proteínas mal plegadas no infecciosas.

Otro estudio desarrollado por el grupo de Jiyan Ma demostró que era posible la generación de priones recombinantes *in vitro* de una manera espontánea, sin la ayuda de ninguna semilla de PrP^{Sc}. Para ello, se utilizó un sustrato basado en la proteína recPrP de ratón complementada con la adición de cofactores: ARN y lípidos. El estudio se realizó en condiciones libre de priones y el

experimento dio lugar a una nueva cepa de prion recombinante generada *in vitro* que demostró tener una infectividad similar a la de los priones procedentes de animales afectados cuando se testó en animales *wild-type* (F. Wang, Wang, & Ma, 2011; Fei Wang et al., 2010). Sin embargo, a pesar de haberse conseguido priones recombinantes infecciosos con un mínimo de cofactores, la técnica presenta mayor eficiencia para la generación de recPrP^{res} cuando se complementa con sustrato homogeneizado de encéfalo.

El uso de PrP recombinante como sustrato para PMCA ofrece la posibilidad de generar y evaluar la capacidad de propagación de PrPs con cualquier mutación o alteración. Por ello, resulta una de las mejores herramientas disponibles actualmente para el estudio de las regiones o residuos aminoacídicos críticos en la capacidad de mal plegamiento, en las barreras de transmisión interespecies o en la determinación de determinadas propiedades biológicas y bioquímicas de los priones, siendo la técnica escogida para el estudio que se presenta en esta tesis doctoral.

5. Modelos animales para el estudio *in vivo* de priones

Aunque los sistemas de cultivo de células infectadas con priones y los ensayos *in vitro* de mal plegamiento de proteínas han contribuido sin duda a nuestro conocimiento de enfermedades priónicas y otros trastornos neurodegenerativos, muchos aspectos de estas enfermedades, incluyendo la propagación de la proteína infecciosa a través del cerebro, solamente puede ser estudiada con precisión en un animal. Debido al énfasis que se le proporciona a la investigación translacional, particularmente en el área de desarrollo de fármacos, los ratones como modelo de trabajo seguirán siendo por antonomasia el sistema elegido para evaluar problemas biológicos *in vivo*.

En los primeros estudios de la enfermedad se utilizaron modelos naturales como chimpancés y ovejas, especialmente enfocados en conocer la capacidad de transmisión de las EETs entre individuos. Más tarde, los modelos roedores facilitaron el estudio de las enfermedades priónicas, aunque sólo permitían el estudio de priones que podían ser adaptables a roedores. Fue a partir del desarrollo de animales transgénicos cuando comenzaron a generarse una gran variedad de modelos con el fin de dilucidar tanto la función biológica de la proteína priónica como sus características bioquímicas y estructurales.

5.1. Modelos *Prnp-knockout*

El uso de técnicas de recombinación homóloga y de clonación de cDNA permitió sobre los años 90 la generación de ratones *Prnp-knockout* (Locht, Chesebro, Race, & Keith, 1986). Debido a la alta conservación de la proteína entre mamíferos (van Rheede, Smolenaars, Madsen, & de Jong, 2003) se creó una gran expectación alrededor de la generación de estos modelos transgénicos, puesto que podrían revelar la función de la PrP^C. Sin embargo, estos animales no mostraron fenotipo claro (Steele et al., 2007), lo que llevó a pensar que o bien la PrP^C no era tan esencial como se creía para la supervivencia y desarrollo del organismo (Bueler et al., 1992; J. C. Manson et al.,

1994; Weissmann & Büeler, 2004) o bien existían mecanismos compensatorios que estaban enmascarando su verdadera función (Steele et al., 2007).

Años después, tras un estudio más detallado, se fueron desvelando diferentes fenotipos en el ratón *Prnp-knockout*, entre los que encontramos su resistencia a la infección por priones (Bueler et al., 1993; Sailer, Büeler, Fischer, Aguzzi, & Weissmann, 1994; Weissmann et al., 1994). Este fenotipo ha sido sin lugar a duda el más importante descrito, ya que corroboraba la hipótesis de sólo proteína, es decir, que se requiere de la proteína endógena para la replicación del prion (A. Aguzzi et al., 2001; A. Aguzzi, Sigurdson, & Heikenwaelder, 2008).

Las primeras líneas de ratones transgénicos en los que se había eliminado el gen de la Pr^{PC} fueron denominadas *Zurich I* (Bueler et al., 1992) y *Edinburgh* (J. C. Manson et al., 1994) en referencia a la ciudad en la que se habían generado. Ambos ratones mostraban resistencia a priones pero ningún otro fenotipo a primera vista. Más tarde se describieron ciertas alteraciones a nivel de transmisibilidad sináptica (Collinge et al., 1994; Herms, Kretzschmar, Titz, & Keller, 1995) y una mayor susceptibilidad a estrés oxidativo (D. R. Brown, Nicholas, & Canevari, 2002), y excitotoxicidad por glutamato (Khosravani et al., 2008; A. Rangel et al., 2007; Walz et al., 1999). Al ratón *Edinburgh*, también se le asociaron alteraciones en ritmos circadianos (Tobler et al., 1996) y déficits cognitivos (Criado et al., 2005).

Años después, se generaron varias cepas nuevas de animales *Prnp-knockout*: la *Nagasaki* (Sakaguchi et al., 1996), la *Rcm0* y la *Zurich II*. Estas no resultaron ser buenos modelos animales, pues los tres mostraban ataxia cerebelar y pérdida selectiva de células de Purkinje (Flechsiger et al., 2003). Estudios posteriores demostraron que este fenotipo era reversible mediante la re inserción de Pr^{PC}, lo que llevó erróneamente a atribuir esta neurodegeneración a la ablación de la proteína priónica celular. La discrepancia en el fenotipo de los diferentes modelos *Prnp-knockout* hizo, más tarde, que se generasen animales transgénicos que expresaban formas truncadas de la proteína. Gracias a ellos, se pudo asociar la neurodegeneración observada a la sobreexpresión de la proteína Doppel, que no se había descrito en los animales *Zurich I* y que parecía ser consecuencia de la alteración en los mecanismos de *splicing* derivada del procedimiento de generación de estos tres modelos transgénicos (Moore et al., 1999).

5.2. Modelos en barreras de transmisión

Algunas EETs pueden transmitirse no solo a individuos dentro de la misma especie sino también a individuos procedentes de distintas especies como consecuencia de la alta similitud existente en la secuencia de la PrP entre mamíferos. Esta habilidad de infectar a otras especies que poseen algunos priones fue demostrado por Gajdusek y colaboradores hace unos 70 años a través de la transmisión del *Kuru* experimentalmente a chimpancés (D. C. Gajdusek et al., 1966). La transmisión de enfermedades priónicas entre especies también se ha observado en la naturaleza, de hecho es la explicación más plausible para la variante de la ECJ en seres humanos (Weissmann &

Aguzzi, 1997). El potencial zoonótico de los priones ha sido ampliamente estudiado e investigado a través del uso de modelos animales, principalmente ratones transgénicos que expresan PrP procedente de otras especies de mamífero (Castilla, Gutierrez-Adan, et al., 2004; Castilla, Gutiérrez-Adán, et al., 2004; Richard E. Race et al., 1995; M. Scott et al., 1989; Glenn C. Telling et al., 1995). Ante el coste, la baja susceptibilidad y los largos periodos de incubación que suponía el trabajar con modelos naturales, surgieron los modelos transgénicos que facilitaban y abarataban las investigaciones *in vivo*. La barrera de transmisión manifestada como un retraso en el tiempo de inicio de la enfermedad y como una tasa de ataque incompleta está determinada principalmente por el porcentaje de similitud entre la secuencia de la PrP del prion y la secuencia de la PrP del nuevo huésped. Esta suposición se ha confirmado midiendo el retraso del inicio de la enfermedad después de la inoculación de priones en diferentes modelos animales que expresan dos PrPs diferentes en contraste con los que expresan sólo la secuencia idéntica al inóculo utilizado (Browning et al., 2004; Windl et al., 2005) o utilizando animales que expresen PrP quimeras (Kupfer, Eiden, Buschmann, & Groschup, 2007; M. Scott et al., 1993). Las barreras de transmisión también pueden estudiarse a través del uso de especies con PrP polimórficas y su susceptibilidad, aumentada o disminuida a determinadas cepas de priones (Laude et al., 2002; O'Rourke et al., 2012).

5.3. Modelos animales y el concepto de cepa

Además de las barreras de transmisión entre PrPs heterólogas, es ampliamente conocido que las inoculaciones de priones a pesar de ser PrP idénticas pueden presentar manifestaciones clínicas e histopatológicas de la enfermedad significativamente variables (periodos de incubación y tasa de ataque) (Carlson et al., 1994). Todas estas propiedades diferentes se encuentran definidas por las distintas conformaciones auto-propagativas que la misma PrP es capaz de adquirir, cepas diferentes del mismo agente infeccioso que, a diferencia de cepas virales o bacterianas, codifican la información en su estructura tridimensional (Jiri Safar et al., 1998). Por ello, las líneas de ratones transgénicos son ampliamente usadas para: 1) distinguir cepas en aislados naturales (Béringue et al., 2006), 2) comprobar si los priones que proceden de diferentes especies conservan las propiedades de cepa que podría ser claro indicio de origen común (Emmanuel A. Asante et al., 2002) o 3) probar la afinidad de diferentes cepas hacia ciertas variantes polimórficas de la PrP o hacia PrPs procedentes de especies diferentes (Meade-White et al., 2007); como las otras propiedades, el tropismo de los priones se encuentra codificado en su conformación al igual que en su secuencia.

5.4. Modelos de sobreexpresión de Prnp o formas mutadas de las proteínas

Cuando un fenotipo determinado es observado tras la ablación de un gen en un animal transgénico es importante confirmar la asociación gen-fenotipo mediante la reinserción del cDNA en el animal *knockout* generado. En el caso de la PrP^C, la sobreexpresión de la forma *wild-type* (salvaje) en un fondo genético *knockout* para la PrP Tg(wtPrP) resulta en la acumulación de PrP^C

que deriva en un fenotipo similar al observado en los animales afectados por enfermedades priónicas. Concretamente, la cepa Tg20 presenta una excitabilidad neuronal incrementada (Alejandra Rangel et al., 2009) y desarrolla ataxia y degeneración del sistema nervioso central y periférico a edades avanzadas (Westaway et al., 1994). Esto ha llevado a pensar que la sobreexpresión de PrP^C puede ser patogénica, ampliando así el espectro de las enfermedades priónicas (Ma, Wollmann, & Lindquist, 2002).

Por otro lado, también se han generado animales transgénicos con mutaciones puntuales en la secuencia de la PrP^C para determinar sus efectos en el desarrollo y transmisión de las enfermedades priónicas. A modo de ejemplo, se ha descrito que mutaciones en la región hidrofóbica central de la PrP^C alteran la estructura y el procesamiento proteolítico de la proteína, modificando su paso por el retículo endoplásmico y, consecuentemente, su orientación a nivel de membrana, dando lugar a formas transmembrana asociadas a procesos neurodegenerativos (Hegde et al., 1998).

5.5. Modelos animales para el estudio de enfermedades priónicas espontáneas

En humanos, las formas genéticas y esporádicas son el 99% de los casos de las enfermedades priónicas registradas. En estas enfermedades, los priones se forman espontáneamente en el cerebro sin la presencia de ninguna fuente exógena de PrP^{Sc}. En las enfermedades priónicas genéticas, las mutaciones en el gen de la PrP da lugar a enfermedades de alta penetrancia como ECJ, GSS o IFF, dependiendo de la mutación. Los resultados obtenidos a través de la generación de ratones transgénicos que sobreexpresan una PrP que contiene mutaciones ligadas a enfermedades priónicas genéticas han sido decepcionantes. La enfermedad neurológica espontánea y los cambios neuropatológicos específicos de la enfermedad por priones no han podido manifestarse en muchas de estas líneas, a pesar de la fuerte sobreexpresión de la PrP portando la mutación a estudiar (E. A. Asante et al., 2009; Emmanuel A. Asante et al., 2013; G. C. Telling et al., 1996). Por el contrario, muchas otras líneas de ratones transgénicos desarrollan disfunción neurológica espontánea y presentan alguna neuropatología específica de la enfermedad priónica, aunque ninguna de ellas presenta la identidad estereotípica de la resistencia a PK que se observa en pacientes con ECJ genética. Hasta hace poco, la transmisión de la enfermedad de estos ratones que enferman de forma espontánea a ratones transgénicos o a ratones que expresan la PrP salvaje (que no desarrollan por sí mismos una enfermedad neurológica espontánea) resultó desafiante, cuestionando si la formación de priones *de novo* que ocurre en los cerebros de estos ratones transgénicos es verdadera.

La mutación humana estudiada de forma extensa en ratones transgénicos es la P102L, la cual es causante de la enfermedad de GSS. Los ratones transgénicos que sobreexpresan la PrP de ratón que contiene la mutación correspondiente (P101L) desarrollan una enfermedad neurodegenerativa espontánea y muestran deposición de PrP mal plegada en sus cerebros (K. K. Hsiao et al., 1990; Nazor et al., 2005; G. C. Telling et al., 1996). Sin embargo, los ratones transgénicos

que expresan bajo número de copias, semejante a cantidades fisiológicas, de la proteína mutante no desarrollan enfermedad espontánea (Nazor et al., 2005), lo que sugiere que la sobreexpresión es necesaria para que la enfermedad se desarrolle dentro de la esperanza de vida de los ratones. Aunque los ratones transgénicos que sobreexpresan la PrP humana con la mutación P102L no desarrollan enfermedad (E. A. Asante et al., 2009), ratones que expresan la PrP de vaca con la correspondiente mutación, aunque en una baja proporción, sí que lo hacen (Torres et al., 2013), lo que sugiere que otros residuos en la PrP son importantes para controlar el fenotipo de la enfermedad en ratones.

Otras de las mutaciones que han dado lugar a neurodegeneración espontánea en ratones transgénicos son la A117V (Yang et al., 2009) y una inserción de 9 octarepeticiones en la región N-terminal de la PrP (Chiesa, Piccardo, Ghetti, & Harris, 1998), ambas relacionadas con GSS en humanos. Por otro lado la D178N (Dossena et al., 2008) que desencadena IFF o ECJ si está presente metionina o valina en el codón 129 de la PrP respectivamente. Sin embargo, la transmisibilidad de la enfermedad no ha podido ser demostrada en ninguna de estas líneas de ratones transgénicos. La mutación E200K, la cual es la causa de la forma genética de ECJ en humanos, da lugar a una enfermedad espontánea en ratones transgénicos que expresan esta mutación en una PrP quimera ratón/humano (Friedman-Levi et al., 2011), sin embargo no ocurre eso cuando la mutación se inserta en la PrP de ratón (G. C. Telling et al., 1996) o en la humana (E. A. Asante et al., 2009). Ratones transgénicos que expresan una PrP sin anclaje a GPI, similar a las producidas en ciertos tipos de GSS, desarrollan una enfermedad espontánea que es acompañada por una gran cantidad de placas amiloides compuestas por PrP en el cerebro y muestran fragmentos resistentes a PK que parecen semejantes a los fragmentos encontrados en los cerebros de enfermos de GSS (Stöhr et al., 2011). Esta enfermedad se transmitió rápidamente a ratones con PrP salvaje, mostrando que los priones sin GPI habían sido de nueva formación en los cerebros de los animales enfermos espontáneamente.

La caracterización de los ratones transgénicos que expresan la PrP del topillo rojo proporcionó una gran sorpresa. A diferencia de los ratones, el topillo rojo es altamente susceptible a un amplio rango de cepas priónicas procedentes de numerosas especies, incluyendo la humana (Agrimi et al., 2008; Di Bari et al., 2013; Nonno et al., 2006). Ratones transgénicos que expresaban la PrP del topillo rojo con la variante polimórfica isoleucina 109 desarrollaron una enfermedad neurodegenerativa espontánea que recapitula todos los signos neuropatológicos de la enfermedad de los priones. Los priones generados espontáneamente indujeron la enfermedad en el mismo modelo animal desencadenándoles una enfermedad priónica con tiempos de incubación de 35 días.

5.6. Modelos animales que expresan formas truncadas de la PrP^C

Muchas otras cepas de ratones transgénicos de sobreexpresión de formas truncadas de PrP^C han sido generados desde entonces, presentando fenotipos distintos según los dominios eliminados (Baumann et al., 2009; A. Li, Christensen, et al., 2007; Shmerling et al., 1998) y

proporcionando información funcional sobre las diferentes regiones estructurales de la proteína. Los más destacados se describen a continuación:

Región N-terminal

Entre estos mutantes encontramos los que presentan alteraciones en la región de las octarepeticiones (en inglés *octarepeats*, OR). Los experimentos realizados *in vitro* indican que este dominio es el principal mediador de la función neuroprotectora de la PrP^C ya que la sobreexpresión de formas truncadas carentes de los OR o la inserción de repeticiones promueve la muerte celular y altera la susceptibilidad a estrés oxidativo *in vitro* (Sakudo et al., 2003; Yin et al., 2006). No obstante, los estudios *in vivo* realizados con los mutantes carentes de los OR (PrP Δ 32-80, PrP Δ 32-93 y PrP Δ 32-106) indican que esta región no es crítica para la función neuroprotectora de la PrP^C, ya que no presentan el fenotipo neurodegenerativo que si se observa *in vivo* tras deleciones más extensas (por ejemplo en el animal PrP Δ 32-121 y PrP Δ 32-134 (o PrP Δ F35)) (A. Li, Piccardo, Barmada, Ghetti, & Harris, 2007; Shmerling et al., 1998). Estudios posteriores han asociado esta función neuroprotectora a la región polibásica adyacente a los residuos 23-31 (Turnbaugh, Westergard, Unterberger, Biasini, & Harris, 2011). Por otro lado, la inserción de nueve repeticiones en los OR asociadas a mutaciones hereditarias de *Prnp* también resultan en un fenotipo neurodegenerativo en el animal transgénico PG14 (Chiesa et al., 1998).

Dominio central

A pesar de que el uso de péptidos sintéticos que mimetizan el dominio central han resultado ser neurotóxicos *in vitro* (Forloni et al., 1993; Gavin et al., 2005), se ha observado que la eliminación del dominio central (del inglés *central domain*, CD) *in vivo* (PrP Δ 94-134 o PrP Δ CD) da lugar a un fenotipo neurodegenerativo progresivo y letal (Baumann et al., 2007), que es reversible mediante la expresión de PrP^C salvaje o de PrP^C carente de la región de los OR. Por otro lado, el mutante PrP Δ 105-125 presenta una toxicidad mucho mayor a la observada en mutantes con deleción de regiones más extensas o incluso en transgénicos de sobreexpresión de Doppel. Parece ser que la falta de este dominio produce un incremento de afinidad de PrP^C hacia su hipotético receptor responsable de la transducción de señales neurotóxicas (A. Li, Christensen, et al., 2007).

Región C-terminal

El extremo carboxi-terminal se caracteriza por la presencia de estructuras secundarias esenciales para mantener la conformación de la proteína, así como la presencia de un grupo GPI capaz de anclar PrP^C a la membrana. Se ha descrito que mutantes con deleciones en las hélices α 1 y α 2 desarrollan un fenotipo neurodegenerativo (Muramoto et al., 1997). Sin embargo, animales transgénicos que expresan PrP^C carentes de GPI (del inglés *anchorless*) no presentan cambios patológicos apreciables (B. Chesebro et al., 2005).

6. Neurotoxicidad

El mecanismo neurotóxico de los priones y la forma tóxica de la PrP responsable del mismo son aun completamente desconocidas. Los depósitos de PrP^{Sc}, la activación microglial y la aparición de cambios espongiiformes o vacuolización caracterizan la patología priónica. Diferentes vías incluyendo sistemas celulares asociados con sinapsis, procesamiento de proteínas, estrés oxidativo, autofagia y apoptosis podrían estar involucradas en este daño tisular; no obstante, el mecanismo neurotóxico no se conoce todavía (Gabor G. Kovacs & Budka, 2009).

Los agregados de PrP^{Sc} han sido la causa principal de neurodegeneración debido a la correlación temporal y anatómica entre la acumulación de esta forma patológica y el desarrollo de cambios neuropatológicos. Sin embargo, han sido descritos enfermos que presentan alteraciones patológicas y/o signos clínicos en ausencia o con mínima presencia de depósitos de PrP^{Sc}. Por otro lado, también existen casos en los que individuos afectados poseen abundante PrP^{Sc} pero una sintomatología menor (Andrew F. Hill et al., 2000; R. Race, Raines, Raymond, Caughey, & Chesebro, 2001). Además, en los animales que expresan PrP^C carente de anclaje a GPI, la acumulación de la PrP^{Sc} es notable mientras que la neurodegeneración es mínima (B. Chesebro et al., 2005), lo que sugiere que los oligómeros de PrP y las fibrillas no son tóxicos *per se* y que necesitan de la PrP^C como mediador de la señal de toxicidad (S. Brandner et al., 1996), respaldando así que no solo es necesaria la presencia de la PrP^C sino que también debe estar anclada a la membrana para mediar de manera eficiente la cascada de toxicidad (A. Aguzzi, 2005). Esta idea cuenta con el respaldo de los primeros modelos de ratón transgénico sin PrP^C, que permitieron descartar que la ausencia de PrP^C o una pérdida de su función debida a la conversión a PrP^{Sc} fuesen la causa de la neurodegeneración (Bueler et al., 1992). A su vez, modelos similares en los que la expresión de PrP puede ser suprimida de forma condicional demostraron que la eliminación de PrP^C en animales con infección priónica revertía la degeneración espongiiforme en sus fases iniciales, previniendo la pérdida neuronal y la progresión de la enfermedad, a pesar de que la acumulación de agregados de PrP^{Sc} extracelulares era comparable a los controles salvajes en estadios terminales de la enfermedad (Mallucci et al., 2007).

Por otro lado, evidencias cada vez mayores apoyan el papel neurotóxico de múltiples estructuras intermediarias –principalmente en un estado oligomérico- anterior a la formación de fibras y/o su interacción específica con membranas (Byron Caughey and Peter T. Lansbury, 2003; Haass & Selkoe, 2007). El descubrimiento de la existencia de diversas formas oligoméricas intermedias en la vía de formación de PrP^C a PrP^{Sc} (Baskakov, Legname, Baldwin, Prusiner, & Cohen, 2002), algunas de ellas con propiedades neurotóxicas en neuronas en cultivo (Kazlauskaite et al., 2005), ha contribuido también a redirigir la atención hacia PrPs oligoméricas solubles, que ya han sido señaladas como las formas más infecciosas (Silveira et al., 2005). La toxicidad de especies oligoméricas de PrP se demostró también utilizando oligómeros y formas fibrilares de la PrP preparadas *in vitro*, que al inocularse en modelos animales y en cultivos neuronales mostraron una neurotoxicidad significativamente mayor que la de las formas fibrilares (Simoneau et al., 2007).

Aun así, sigue sin comprenderse cómo interactúan entre sí la PrP^C y los oligómeros de PrP^{Sc} o qué cascadas de señalización se activan como consecuencia de dicha interacción y que conducen a la muerte de las neuronas. Descubrimientos recientes en otras enfermedades neurodegenerativas relacionadas con mal plegamiento de proteínas como la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson, en las que especies oligoméricas precursoras de fibras amiloides han sido también identificadas como las formas más neurotóxicas (M. Danzer & J. McLean, 2011), han centrado la atención en posibles mecanismos comunes de toxicidad, que resultan particularmente interesantes de entre la gran variedad de mecanismos propuestos para las enfermedades priónicas (Adriano Aguzzi & Calella, 2009). Además, las propiedades fisicoquímicas de estas estructuras intermediarias tales como el tamaño, tendencia a la agregación y estado de glicosilación parecen correlacionar con características clínico-patológicas (Piero Parchi, Strammiello, Giese, & Kretzschmar, 2011), sugiriendo así que los fragmentos de la PrP^{Sc} poseen neurotoxicidad variable y que causan lesiones distintas como consecuencia de sus diferentes propiedades (P. Parchi et al., 1998).

Por otro lado, un tema que podría ser relevante en la neuropatología mediada por priones es el papel de la microglía, sobre todo, la dicotomía entre su posible contribución a la neurodegeneración versus neuroprotección. Diversas evidencias indican que la PrP^{Sc} puede ser eficientemente eliminada del cerebro y que la fagocitosis mediada por microglía representa un mecanismo importante de eliminación (Beringue et al., 2000; Luhr et al., 2004). Sin embargo, también se ha demostrado que la microglia activada puede asumir un fenotipo agresivo y liberar citoquinas inflamatorias que fomentan la apoptosis neuronal y la neurodegeneración (Colm Cunningham, Wilcockson, Campion, Lunnon, & Perry, 2005). Estudios recientes han contribuido a arrojar algo de luz en los eventos moleculares que regulan la activación microglial durante la infección por priones. En el caso de ratones afectados por enfermedad priónica, se demostró que la microglía se activaba temprano en el proceso de la enfermedad, incluso en ausencia de extensos depósitos detectables de PrP^{Sc} (A. E. Williams, Lawson, Perry, & Fraser, 1994). Este fenotipo activado, que se ha denominado antiinflamatorio o benigno, muestra bajos niveles de citoquinas inflamatorias y niveles fácilmente detectables de TGF- β (factor de crecimiento transformante β , del inglés *transforming growth factor β*) y PGE2 (prostaglandina E2) (C. Cunningham et al., 2003; Perry, Cunningham, & Boche, 2002). Aunque no hay evidencias de que un aumento en los niveles de PGE2 sea perjudicial, ni que tampoco lo sea el TGF- β , esta situación puede empeorar significativamente en presencia de una inflamación sistémica. De hecho, cuando los ratones fueron desafiados sistémicamente con endotoxina para imitar una infección intercurrente, esta maniobra condujo a un cambio dramático en el fenotipo microglial con un perfil agresivo de citoquinas inflamatorias y un aumento de la apoptosis neuronal (Colm Cunningham et al., 2005). Este concepto de conmutación rápida del fenotipo de microglía está por supuesto totalmente de acuerdo con lo que se conoce sobre el grado de plasticidad de las células del linaje de macrófagos.

Cabe destacar, que uno de los mecanismos más prometedores que relacionan el mal plegamiento de proteínas con la pérdida neuronal es el que propone que la toxicidad viene mediada

por una alteración de la respuesta a proteínas mal plegadas (del inglés *Unfolded Protein Response*, UPR). Este es un mecanismo de protección que se activa ante el aumento de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico para hacer frente al estrés celular y mantener la homeostasis proteica, reduciendo la síntesis de proteínas temporalmente y aumentando la producción de chaperonas. La reducción de la síntesis proteica se da mediante el reconocimiento de proteínas mal plegadas por la proteína BiP (del inglés *Binding immunoglobulin Protein*) en el retículo endoplasmático que activa la proteína PERK (del inglés *Protein kinase RNA-like ER kinase*) que se autofosforila y fosforila a su vez la proteína eIF2 α (del inglés *Eukaryotic translation initiation factor 2 α*), resultando en una reducción de la traducción proteica además de inducir la traducción de chaperonas y la síntesis de lípidos para aumentar la capacidad del RE. Normalmente, la UPR es temporal y la eIF2 α es rápidamente desforforilada, lo cual no sucede en los modelos de enfermedad priónica estudiados, conduciendo a una sostenida inhibición de la expresión de proteínas sinápticas que acaba en neurodegeneración. La inhibición farmacológica de la UPR sostenida en ratones infectados por priones ha demostrado una protección neuronal extensa en el hipocampo, donde no hay apenas pérdida neuronal ni cambios espongiiformes (Halliday, Radford, & Mallucci, 2014).

6.1. Neurotoxicidad y la región N-terminal de la proteína priónica

Habiendo establecido el papel central de PrP^{Sc} y PrP^C en la patogénesis de las enfermedades priónicas, la cuestión crítica se ha convertido progresivamente en la búsqueda de un vínculo entre PrP^{Sc}, neurotoxicidad e infectividad. Aunque la correlación temporal y anatómica entre la formación de PrP^{Sc} y el desarrollo de la infectividad y los cambios neuropatológicos es a menudo evidente en las prionopatías, la correlación global entre los niveles de PrP^{Sc}, infectividad y neurotoxicidad puede ser débil o incluso ausente.

Después de haberse demostrado que ratones carentes de PrP eran resistentes a la enfermedad por priones (Bueler et al., 1993), Charles Weissmann y Adriano Aguzzi comprobaron si introduciendo de nuevo el gen de la PrP podría rescatarse la susceptibilidad a la infección por priones y, efectivamente así sucedió (Fischer et al., 1996). Debido a que la PrP^{Sc} es parcialmente resistente a la digestión por PK con un fragmento susceptible de unos 90 residuos aminoácidos del extremo N-terminal, quisieron comprobar si la PrP que carecía de este fragmento N-terminal podría también rescatar la susceptibilidad. El péptido señal, que abarca los aminoácidos del 1 al 22, se dejó intacto, con lo que la proteína podía ser perfectamente translocada en el retículo endoplasmático. Ante la inseguridad de no saber si la nueva PrP sería capaz de ser translocada de forma correcta se optó por dejar intactos los aminoácidos inmediatamente posteriores al péptido señal, dejando así presentes en la PrP los residuos que abarcan del 23 al 31, fue de este modo como crearon ratones que expresaban la proteína priónica carente de los aminoácidos que van del 32 al 80 (PrP Δ 32-80) (Fischer et al., 1996). Estos ratones resultaron ser susceptibles a la enfermedad por priones y, tras este hallazgo, se inició la búsqueda de los aminoácidos del extremo N-terminal que podían ser eliminados sin que se perdiera la capacidad de propagar priones.

La generación de diversos modelos transgénicos con deleciones N-terminal revelaron que los residuos cuya eliminación resultaba en efectos más drásticos se encuentran alrededor de los aminoácidos 93 y 106 según la secuencia y numeración del ratón (A. Aguzzi, Baumann, & Bremer, 2008). Sin embargo, los dos primeros mutantes; $\Delta 32-121$ y $\Delta 32-134$, mostraron problemas de diferente índole: sufrieron una neurodegeneración espontánea del cerebelo, la cual no era transmisible, no implicaba agregación de PrP y solo se producía cuando el fondo genético de los animales era *knockout* (pudiendo ser rescatado si era co-expresado con la PrP completa) (Shmerling et al., 1998). La decisión original de dejar intactos los residuos 23-31 en los ratones procedentes de la experimentación de Shmerling y colaboradores resultó ser serendipia. Más tarde y de forma independiente, los investigadores Stanley Prusiner y David Harris crearon otros mutantes los cuales todos mostraban deleciónado el aminoácido 23 en adelante, dando lugar a ratones totalmente sanos y viables (Muramoto et al., 1997; M. R. Scott et al., 1992; G. C. Telling et al., 1996; Westergard, Turnbaugh, & Harris, 2011a).

Todos estos resultados revelaron la estrecha relación entre toxicidad, la presencia de los residuos iniciales del N-terminal y la ausencia de la región inmediatamente posterior de la PrP. Con la intención de acotar con mayor precisión esta región y estudiar en mayor detalle la toxicidad observada en los modelos de Shmerling, Aguzzi y Harris generaron una serie de mutantes adicionales. Fue así como se obtuvo el fenotipo más perjudicial asociado a la expresión de PrP truncadas conocido hasta la fecha, siendo este el la proteína mutante ΔCR (PrP $\Delta 105-125$) procedente del laboratorio de David Harris; los ratones que expresan esta proteína sufren letalidad neonatal si la PrP completa no es co-expresada (A. Li, Christensen, et al., 2007). La región 105-125 cobró mayor interés como un posible dominio con especial implicación en la toxicidad de la PrP por tres motivos. En primer lugar, el estudio llevado a cabo por Shmerling y colaboradores señaló los residuos alrededor de la posición 106 como críticos en la neurotoxicidad. En segundo lugar, era sabido que un péptido sintético derivado de esta región (PrP106-126) resultaba ser tóxico cuando se aplicaba a cultivos neuronales que expresaban PrP, de lo contrario no lo era en aquellas carentes de la proteína priónica (D. R. Brown, Herms, & Kretzschmar, 1994). Y por último, la región 105-125 es una de las zonas más conservada, siendo virtualmente idéntica en las PrPs desde el pez cebra hasta humanos (Rivera-Milla et al., 2005).

Sin embargo, las dudas acerca de la relación del fenotipo tóxico con la toxicidad que tiene lugar en el curso de las enfermedades priónicas siguen patente. ¿Fueron los modelos de Shmerling y el ΔCR simplemente un accidente científico sin relevancia para las enfermedades priónicas o proporcionaban por el contrario la clave para entender la neurodegeneración inducida por priones? El hecho de que las neuronas de forma individual deben expresar PrP anclada a membrana para ser susceptibles a la neurotoxicidad causada por priones (Sebastian Brandner et al., 1996), lleva a pensar que quizás, la PrP^C completa desencadena una señal tóxica cuando entra en contacto con la PrP^{Sc} y mutantes como el ΔCR están continuamente activando esta señal tóxica.

Además, la existencia de enfermedades priónicas de origen genético causada por inserciones de octarepeticiones en la región N-terminal de la PrP (del inglés *octapeptide repeat insertions*, OPRI) muestran con acusada relevancia la importancia de esta región aunque estas mutaciones aumentan en extensión la región N-terminal de la PrP, al contrario que las deleciones mencionadas anteriormente. Estas inserciones representan un subtipo bastante inusual de las enfermedades genéticas de priones. Algunos han sido transmitidos a primates o ratones, pero otros casos han resultado difíciles o imposibles de transmitir (P. Brown et al., 1994; Mead et al., 2006). Por otro lado, existen modelos murinos que expresan la PrP con una inserción de 9 octarepeticiones, los cuales desarrollan enfermedad espontánea que no es transmisible (Chiesa et al., 1998). Y mientras las enfermedades priónicas son por lo general demencias progresivas rápidas con una duración típica de unos 6 meses (Pocchiari et al., 2004), los pacientes con OPRI a menudo muestran una duración de la enfermedad del orden de una década (Mead et al., 2006). La edad de inicio de la enfermedad también depende en gran medida del residuo existente en el codón 129, mientras que en otras enfermedades priónicas genéticas como la asociada a la mutación E200K de la PrP parece poseer poca o ninguna influencia en el comienzo de la enfermedad (Mead et al., 2006; Minikel et al., 2014).

La descripción de neurotoxicidad inducida por anticuerpos específicos para ciertas regiones de la PrP proporcionó nueva información sobre posibles mecanismos de toxicidad, ya que cuando interactuaban con la proteína eran capaces de desencadenar una respuesta neurotóxica. Adriano Aguzzi demostró recientemente que una serie de anticuerpos específicos para la región C-terminal de la PrP eran tóxicos, tanto en cortes de cultivo organotípico cerebeloso como *in vivo*. Por el contrario, los anticuerpos que se unían a la región N-terminal de la proteína prevenían la toxicidad (Sonati et al., 2013). Estos resultados sugieren que la toxicidad de los anticuerpos específicos de la región C-terminal de la proteína podría estar mediada por la región N-terminal.

Se pueden observar 3 paradigmas diferentes en los que el extremo N-terminal de la proteína priónica parecería estar asociada de alguna forma al desencadenamiento de una señal tóxica. La pregunta es si el mecanismo de toxicidad observado en estos casos es el mismo y, si es así, si este mecanismo de toxicidad asociado al extremo N-terminal de la PrP es semejante al que ocurre durante el curso de una infección por priones.

Si nos basamos en lo que llaman la hipótesis de la región N-terminal (Evans & Millhauser, 2017) se podría decir que sí, en todos estos paradigmas, la PrP es tóxica a través del mismo mecanismo. Por lo tanto, los anticuerpos que desencadenan toxicidad y las deleciones son modelos de neurotoxicidad de priones *bona fide* y aquellos casos de OPRI que presentan una ínfima transmisibilidad son enfermedades priónicas genuinas, sólo que presentarían una PrP^C con mayor toxicidad intrínseca o mayor susceptibilidad a la toxicidad inducida por PrP^{Sc}.

Esta hipótesis mencionada anteriormente, se encuentra respaldada por diferentes declaraciones presentadas por investigadores como Adriano Aguzzi, David Harris y Glenn Millhauser. Algunos ejemplos de éstas son las siguientes:

- La idea de que la PrP^C sea la responsable de desencadenar la respuesta neurotóxica se apoya en el hallazgo de que los anticuerpos de unión a PrP^C pueden inducir neurotoxicidad y que los ratones que expresan PrP^C carente de ciertos dominios desarrollan una neurodegeneración espontánea (A. Aguzzi & Falsig, 2012).
- Las proteínas del prion carente de ciertas regiones críticas dan lugar a fenotipos neurodegenerativos fatales cuando son expresadas en ratones transgénicos, lo que puede ser un reflejo de alteraciones en la función normal de la PrP^C. Queda por determinar si están implicadas las mismas vías cuando la respuesta neurotóxica se da en presencia de PrP^{Sc} (Biasini et al., 2012).
- ¿Podría este modelo neurotóxico de la región N-terminal ayudar a explicar otros experimentos que demuestran efectos neurotóxicos y tal vez ciertos aspectos de las enfermedades neurodegenerativas? (McDonald & Millhauser, 2014).

Todos los investigadores mencionados anteriormente coinciden en que el denominador común en los diferentes paradigmas que describen toxicidad asociada a PrP podría ser su extremo N-terminal, que se encontraría estrechamente involucrada en el mecanismo de toxicidad o incluso ser el mediador de la misma en las enfermedades priónicas. Se postula que podría inducir la muerte neuronal a través de la formación de poros en la membrana o mediante la interacción con otras proteínas como las que se encuentran en los canales iónicos (A. Aguzzi & Falsig, 2012; Solomon, Huettner, & Harris, 2010). Por otro lado, Glenn Millhauser ha planteado la hipótesis y ha generado datos *in vitro* apoyando la noción de que el extremo N-terminal normalmente y en estado basal se acopla a la región C-terminal de la PrP. Concretamente, los cationes de cinc de la región N-terminal de la PrP dirigen un contacto terciario entre esta región y una superficie específica del dominio C-terminal (zona que alberga la mayoría de mutaciones de la PrP relacionadas con las enfermedades priónicas familiares). Por ello, las mutaciones en esta región dan lugar a un debilitamiento de la unión entre la región C- y N-terminal provocando una desestabilización de la proteína priónica (Spevacek et al., 2013). Las proteínas priónicas que presentan deleciones en la región N-terminal permiten teorizar sobre posibles mecanismos moleculares por los que la N-terminal de la PrP mediaría la toxicidad. No sólo que la región flexible sea demasiado corta como para llegar al sitio de acoplamiento, ya que la toxicidad que presenta la proteína delecionada $\Delta 105-125$ es mucho peor que el que presenta la proteína que posee la deleción $\Delta 32-134$. En lugar de eso, podría deberse a un cambio conformacional en el que la región flexible de la proteína se volviera inflexible, o simplemente que, como Glenn Millhauser ha propuesto, la proteína fuera incapaz de sufrir corte proteolítico alfa [corte proteolítico alrededor del residuo aminoacídico H111 para dar lugar a los

fragmentos N1 y C1 (S. G. Chen et al., 1995; Harris et al., 1993)] para poder interrumpir su actividad neurotóxica (McDonald, Dibble, Evans, & Millhauser, 2014; McDonald & Millhauser, 2014).

Aún queda por demostrar definitivamente que la toxicidad observada en los modelos con truncamientos en la región N-terminal o inducida por anticuerpos anti-PrP sea la misma que se da durante la infección priónica. Investigaciones procedentes del laboratorio de Aguzzi muestran que al menos la toxicidad mediada por anticuerpos y la de priones auténticos comparten el mismo mecanismo (Herrmann et al., 2015). Básicamente exponen cortes del cerebelo en cultivos organotípicos (del inglés *cerebellar organotypic cultured slices*, COCS) a priones o al anticuerpo POM1 que induce toxicidad. Sobre estos dos modelos experimentales prueban una batería de diferentes manipulaciones genéticas, anticuerpos y compuestos químicos para comprobar si se da el mismo efecto en ambos. Estos experimentos señalaron que los inhibidores de calpaína, los neutralizadores de las especies reactivas de oxígeno o ROS (del inglés *reactive oxygen species*) y los anticuerpos contra la región N-terminal de la PrP son capaces de rescatar de la neurodegeneración tanto a los cultivos expuestos a POM1 como a los cultivos que se inocularon con priones auténticos, sugiriendo que estos compuestos bloquean una vía neurotóxica compartida. El hecho de que el polisulfato de pentosano, el rojo congo y la anfotericina B bloqueen la neurotoxicidad inducida por priones pero no la que induce el anticuerpo POM1, podría estar relacionado con el bloqueo de la replicación de priones, que se produce antes de disparar el mecanismo de toxicidad y que no se da en la toxicidad inducida por el anticuerpo POM1. Este hecho quedó respaldado por la reducción evidente del título de priones causado por los tratamientos con estos compuestos. A su vez, la demostración de que el uso de antagonistas de los receptores de glutamato o de los canales calcio en el RE no bloquean el daño producido por priones o POM1 indicaron, en consonancia con la literatura previa, que la excitotoxicidad y la señalización del glutamato juegan un papel importante en la toxicidad de la PrP (Um et al., 2013; Watt et al., 2012; You et al., 2012).

Sin embargo, también hay evidencias que parecen indicar que la toxicidad inducida por anticuerpos difiere en ciertos aspectos de la inducida por priones, aunque sugiere nuevamente una cierta implicación de la región N-terminal de la PrP en estas diferencias. COCS que expresan la PrP con la delección $\Delta 32-93$ resultan resistentes a la toxicidad mediada por el anticuerpo POM1 (Sonati et al., 2013), sin embargo, los ratones que expresan la PrP con la delección $\Delta 32-93$ son susceptibles a la infección por priones (Flechsigt et al., 2000). Estos resultados podrían indicar que el papel de la región N-terminal en la neurotoxicidad no es determinante. No obstante, aunque los ratones $\Delta 32-93$ pueden ser infectados con priones RML y, finalmente sucumbir a la enfermedad, muestran tiempos de incubación mucho más largos que los ratones que expresan niveles comparables de la PrP completa de ratón (Flechsigt et al., 2000). Esto consolidaría la hipótesis de la región N-terminal y su papel en la neurotoxicidad: la delección de los aminoácidos del 32 al 93 suprime la toxicidad que desencadena la región N-terminal, de modo que ante la infección de priones, estos necesitan de una mayor replicación y, por tanto, una mayor acumulación para desencadenar toxicidad neuronal. Pero si este fuese el caso, la titulación priónica en el cerebro de los ratones que expresan la PrP $\Delta 32-$

93 debería ser más alta que la que presentan los ratones cuya PrP es de tipo salvaje; siendo de hecho 1,5 veces más bajo (Flechsig et al., 2000). Además, la patología en los ratones PrP Δ 32-93 es atípica, con una pérdida neuronal menor en el cerebro.

Otros mutantes han sido utilizados con el propósito de corroborar y/o esclarecer los fundamentos que existen detrás de la hipótesis de la región N-terminal de la PrP y su posible implicación en la neurotoxicidad. Los ratones que expresan PrP Δ 32-80 son completamente susceptibles a la infección por priones, presentan una patología típica de la enfermedad y poseen unos tiempos de incubación semejantes a los ratones que expresan la PrP salvaje y a unos niveles de expresión comparables (Fischer et al., 1996). Por lo tanto, si COCS que expresan la delección 32-80 mostraran resistencia a la toxicidad que desencadena el anticuerpo POM1, sería una posible señal de que la toxicidad del extremo N-terminal no es el factor determinante del desarrollo de la enfermedad causada por priones. En otro intento independiente de corroborar esta hipótesis, se utilizaron delecciones N-terminales que se extendían más allá del mismo. Ejemplos de ello fueron ratones que expresan la PrP Δ 23-88 que al ser inoculados desarrollan una enfermedad priónica clásica con periodos de incubación mucho más prolongados de lo normal (Supattapone et al., 2001); y ratones que expresan PrP Δ 23-88, Δ 141-176 (“miniprion”) (Supattapone et al., 1999) que muestran en el segundo pase una alta susceptibilidad a RML, con unos tiempos de incubación rápida y una neuropatología priónica clásica. Así que si COCS preparados con esta construcción tuvieran resistencia total a la toxicidad inducida por POM1, invalidaría el papel de la región N-terminal en la neurotoxicidad.

Debido a los datos obtenidos hasta el momento, quizás el planteamiento tendría que cambiarse y plantearse qué cantidad de los daños que causan la enfermedad por priones es atribuible a la toxicidad mediada por la región N-terminal de la proteína priónica. Según lo obtenido por las experimentaciones del laboratorio de Aguzzi parecen estar implicadas tres diferentes vías en la neurotoxicidad mediada por el extremo N-terminal: la activación de calpaína, la producción de ROS y la fosforilación de PERK. Sobre las dos últimas vías existen varios experimentos en la literatura abordando el grado de implicación de cada una de ellas en el tiempo hasta alcanzar la fase terminal de la enfermedad. Por ejemplo, se ha observado que la inhibición de la producción de ROS prolonga la supervivencia en un 4% (Sorice et al., 2014) y la sobre-expresión de SOD1 (del inglés *superoxide dismutase 1*) humana aumenta el tiempo de vida hasta un 19% (Tamgüney et al., 2008), a pesar de que en el laboratorio de Aguzzi han mostrado que las ROS que se encuentran involucradas en la toxicidad mediada por priones y por POM1 son extracelulares (Herrmann et al., 2015). La inhibición de la activación de PERK por sobre-expresión lentiviral de GADD34 (del inglés *growth arrest and DNA damage-inducible protein*) (Moreno et al., 2012) o con una pequeña molécula inhibidora de PERK (Moreno et al., 2013) parecen aumentar el tiempo de vida alrededor de un 12%.

Existe una gran indeterminación sobre el papel que posee la región N-terminal de la proteína priónica y todos los resultados que se han ido obteniendo a lo largo de los años no

concluyen de forma fehaciente un mecanismo de toxicidad en el que se encuentre claramente implicado el extremo amino terminal de la proteína priónica. Recientemente ha surgido un gran interés por la región más amino terminal de la proteína, es decir, por la secuencia aminoacídica que se encuentra inmediatamente después al péptido señal (residuos 23-31, KKRPKGGW); esto se debe a que experimentos anteriores con PrP delecionadas en la región N-terminal pero que mantenían estos aminoácidos [Δ 32-121 y Δ 32-134 (Shmerling et al., 1998), Δ 94-134 (Baumann et al., 2007), y Δ 105-125 (A. Li, Christensen, et al., 2007)] resultaron inducir una enfermedad neurológica espontánea. Así fue como Westergard y colaboradores haciendo uso de una combinación de animales transgénicos y cultivos celulares dilucidaron que la ausencia de los residuos 23-31 elimina la toxicidad en ratones carentes de PrP endógena como en ensayos de cultivos celulares en las mismas condiciones (Westergard, Turnbaugh, & Harris, 2011b). Más tarde, se crearon ratones transgénicos que expresaban la PrP Δ 23-31 los cuales mostraron una importante disminución en la susceptibilidad a la infección por priones y acumularon reducidos niveles de PrP^{Sc} en sus cerebros; demostrando además, que los residuos 23-31 pertenecen a un sitio crítico de la PrP^C que interacciona con la PrP^{Sc}, abriendo así la posibilidad de identificar un nuevo sitio diana para la inhibición de la formación de la PrP^{Sc} (Turnbaugh et al., 2012). Hace poco más de un año, a través de ratones transgénicos que expresaban la PrP ovina con una deleción de los residuos 23 al 26 o mutada esta región N-terminal (KQHPH en lugar de KKRPK), se observó que estos animales presentaban una susceptibilidad variable dependiente de la cepa de priones que se utilizara para desencadenar la infección (Khalifé et al., 2016), ratificando así la importancia de esta región polibásica como moduladora de la toxicidad. Con la intención de esclarecer por qué las proteínas priónicas delecionadas en su región N-terminal que mantienen su extremo 23-31 son tan neurotóxicas, surge recientemente un estudio en el que se han descubierto nuevas características mecanísticas de la toxicidad inducida por la PrP^C (Wu et al., 2017). Los autores muestran que ligandos que se unen a la región N-terminal suprimen la respuesta neurotóxica que genera la PrP Δ CR de igual forma que lo hacen las mutaciones en los residuos pertenecientes a la región polibásica situada en el extremo amino terminal. Cabe destacar que la expresión de forma independiente de la región N-terminal en ausencia del dominio C-terminal también induce enfermedad espontánea, lo que hace indicar que el dominio N-terminal por sí solo es capaz de actuar como un efector autónomo determinante de la toxicidad. Además, también revelan que los anticuerpos anti-PrP dirigidos a epítomos del extremo C-terminal inducen corrientes iónicas en cultivos celulares que expresan la PrP^C salvaje y acaban causando la degeneración de dendritas en las neuronas del hipocampo. Estos resultados junto con la evidencia estructural de los experimentos de RMN heteronuclear, sugieren un modelo molecular para la PrP^C en el que el dominio N-terminal actúa como un efector neurotóxico cuya actividad está regulada por el dominio C-terminal (Wu et al., 2017).

Una gran variedad de estudios recientes convergen en la importancia del extremo amino terminal y en concreto en la secuencia polibásica de la PrP como moduladora en la toxicidad de ciertas PrP con deleciones internas, en la eficiencia de conversión de PrP^C a PrP^{Sc} y en la habilidad

de mantener la propagación priónica. No obstante, aún queda mucho camino por recorrer para dilucidar definitivamente los mediadores y determinantes de la neurotoxicidad inducida por priones y así poder plantear nuevas estrategias farmacológicas utilizando esta región como diana terapéutica.

7. Factores celulares que determinan la conversión de la PrP^C y la propagación de los priones

Algunos autores han propuesto que moléculas de identidades distintas a la PrP conocidas como cofactores, posiblemente actuando como chaperonas, podrían estar involucradas en la conversión de PrP^C a PrP^{Sc} y, por tanto, en la propagación de priones (Fernández-Borges, Di Bari, et al., 2017; Ma, 2012; Silva et al., 2011). Las primeras evidencias de una posible existencia de cofactores necesarios para la propagación surgió a partir de las infecciones de priones en ratones transgénicos que co-expresaban la PrP^C de ratón y humana. Estos ratones resultaron ser resistentes a la infección por priones humanos mientras los ratones que solamente expresaban la PrP^C humana desarrollaban enfermedad priónica al ser inoculados con los mismos priones (G. C. Telling et al., 1994). Estos resultados sugirieron que la PrP^C de ratón era capaz de inhibir la conversión de PrP^C humana secuestrando algún cofactor desconocido. Además, los niveles relativamente bajos de infectividad específica obtenidos durante estudios *in vitro* que utilizan solamente moléculas puras de PrP^C como sustrato (Colby et al., 2010; J. I. Kim et al., 2010; Makarava et al., 2010) también sustentan la necesidad de cofactores en la replicación de priones.

Varios compuestos incluyendo ARN, ácidos nucleicos homopoliméricos como poli (A) y poli (dT) y ADN inespecífico han mostrado capacidad para promover la propagación *in vitro* de priones (Adler et al., 2003; Cordeiro et al., 2001; N. R. Deleault, Harris, Rees, & Supattapone, 2007). Por el contrario, otras moléculas tales como ácidos nucleicos sintéticos, heparina, albúmina, ácidos grasos e iones metálicos pueden llegar a disminuir la replicación de priones *in vitro* (Karim Abid, Morales, & Soto, 2010). A pesar de que chaperonas como Hsp104 y GroEL (D A Parsell & Lindquist, 1993) son capaces de promover el proceso de conversión *in vitro* de la PrP^C de hámster, chaperonas químicas incluyendo a la sacarosa, trehalosa y el dimetil sulfóxido inhiben el proceso de conversión (DeBurman, Raymond, Caughey, & Lindquist, 1997). Proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG, del inglés *Heparan Sulfate ProteoGlycans*) han demostrado ser capaces de unir PrP^C y PrP^{Sc} para actuar como soporte o andamio para la fibrilación de la PrP^{Sc} (Wong et al., 2001), estos unen la PrP^{Sc} a la superficie celular y facilitan su internalización vía macropinocitosis (Horonchik et al., 2005; Wadia, Schaller, Williamson, & Dowdy, 2008) y también se unen a la PrP^C, aumentando de esta forma el tráfico subcelular de vesículas cubiertas de clatrina (S. L. Shyng, Heuser, & Harris, 1994).

Centrándonos en los cofactores que aumentan la conversión de la PrP^C *in vitro*, un hecho de los más significativos fue que ARN producido por el mismo huésped facilitó la conversión de la PrP^C a la PrP^{Sc} *in vitro* (Nathan R. Deleault et al., 2005; Nathan R. Deleault, Lucassen, & Supattapone, 2003; Geoghegan et al., 2007; Saborio et al., 2001; Fei Wang et al., 2010). Concretamente, el ARN

actúa como un mero catalizador del proceso de plegamiento de la PrP (Fernández-Borges, Di Bari, et al., 2017; Fei Wang et al., 2017). Uno de los últimos estudios muestra que el ARN requerido para la amplificación *in vitro* de la PrP^{Sc} es dependiente de especie, dado que la PrP^{Sc} derivada de hámster parece ser altamente dependiente de la presencia de ARN, mientras que la PrP^{Sc} derivada de ratón no lo es (Nathan R. Deleault, Kascsak, Geoghegan, & Supattapone, 2010). Otro estudio reveló amplificaciones con una dependencia similar al ARN en 6 cepas priónicas de hámster (Gonzalez-Montalban, Makarava, Savtchenko, & Baskakov, 2011). Otros factores implicados en la modulación de la replicación de priones *in vitro* son ADN y fosfolípidos. La polimerización de la PrP recombinante de ratón se potenció en presencia de ácidos nucleicos y la unión del ADN específico de secuencia a la proteína recombinante la hizo pasar de una conformación α -helicoidal a una isoforma soluble enriquecida en láminas β muy similar a lo que se encuentra en el estado fibrilar de la PrP^{Sc} (Cordeiro et al., 2001). A diferencia del ARN, un fosfolípido esencial de la membrana como es el fosfatiletanolamina (PE, del inglés *phosphatidylethanolamine*) se describió como un cofactor altamente promiscuo siendo capaz de promover la propagación de priones utilizando proteínas recombinantes procedentes de diferentes especies de mamíferos (Nathan R. Deleault, Piro, et al., 2012).

La identidad específica y las funciones de los cofactores aún no han sido completamente descifradas. Los cofactores podrían actuar como una molécula catalítica que se une tanto a la PrP^C como a la PrP^{Sc} acercando estos y reduciendo así su energía de activación para que se dé el proceso de conversión o, simplemente, podría unirse solo a la PrP^{Sc} y estabilizar así su conformación. Los cofactores también podrían desempeñar un papel fundamental en las propiedades de cepa de la nueva PrP^{Sc} generada, proporcionando propiedades específicas y por tanto modulando la infectividad de los mismos (Fernández-Borges, Di Bari, et al., 2017). Los datos preliminares sobre los priones obtenidos *in vitro* parecen indicar que la presencia de cofactores aumenta la infectividad *in vivo* de priones, mientras que la información recogida sobre la cuestión de las cepas parece ser inconsistente. Por ejemplo, el uso de PE como cofactor único en el proceso de propagación permitió la adaptación de dos cepas nativas diferentes de prion en una misma cepa resultante. Esto sugiere que un solo cofactor es capaz de dirigir la conversión de diferentes cepas en una única cepa con sus propias características fenotípicas (Nathan R. Deleault, Walsh, et al., 2012). Mientras que en otro estudio se encontró que la replicación en presencia de ARN no modifica las propiedades de la cepa del prion RML (Saa et al., 2012).

Aunque como puede observarse hasta el momento existen informes previos de algunos cofactores que favorecen la formación de priones, tales como ciertos polianiones y lípidos (Nathan R. Deleault, Piro, et al., 2012; Fei Wang et al., 2010), en esta tesis doctoral nos enfocamos en el uso del dextrano sulfatado debido a su naturaleza polianiónica similar a la de los compuestos mencionados anteriormente, para asegurar mecanismos de selección supuestamente semejantes a los que promueven los cofactores más estudiados a día de hoy. Sorprendentemente el dextrano sulfatado ha sido un compuesto utilizado como inhibidor, siendo utilizado también para el

tratamiento de otras enfermedades o síntomas como la malaria y la trombosis. Uno de los primeros estudios en los que se observa el uso de este dextrano es el llevado a cabo por Murayama y colaboradores (Murayama et al., 2010), en el que describen una detección ultrasensible de PrP^{Sc} que proviene de EEB en reses. En un principio estos resultados resultaron ser inesperados debido a la naturaleza del dextrano sulfatado como inhibidor de *scrapie* tanto *in vivo* (Farquhar & Dickinson, 1986) como *in vitro* (Caughey & Raymond, 1993). El dextrano podría acelerar la formación de PrP^{Sc} actuando como moléculas accesorias que facilitan o estabilizan interacciones entre PrP^{Sc}, PrP^C y cofactores presentes en los homogeneizados de cerebro. Estos hallazgos sugieren que el dextrano, al igual que otros cofactores, posee cierto tropismo por determinadas cepas promoviendo su propagación en algunos casos, EEB, o por el contrario, inhibiendo o dificultando la de otras como el *scrapie*, actuando como un selector.

Finalmente, una de los mayores motivos por el que en esta tesis se opta por el uso del dextrano sulfatado como cofactor con el fin de seleccionar ciertas cepas priónicas *in vitro* de priones se debe a que, un reciente estudio publicado por nuestro laboratorio muestra que los cofactores no son necesarios para la propagación priónica pero sin embargo influyen en su resultado significativamente. Por la tanto, a pesar de no formar parte de la partícula infecciosa, los cofactores parecen estar implicados en la propagación y/o mantenimiento de ciertas cepas, probablemente restringiendo la variabilidad y favoreciendo la generación de algunas de ellas (Fernández-Borges, Di Bari, et al., 2017).

OBJETIVOS

1. Estudio *in vitro* del efecto de determinadas deleciones en la ORF de la PrP murina en la capacidad de mal plegamiento.
 - a. Evaluación de la capacidad de mal plegamiento inducido por semilla de las diferentes PrP deleccionadas.
 - b. Evaluación de la capacidad de mal plegamiento espontáneo de las distintas PrP deleccionadas.
2. Caracterización bioquímica y biológica de las proteínas mal plegadas generadas.
3. Estudio de la región N-terminal y su influencia sobre el mantenimiento de las propiedades bioquímicas y biológicas de las proteínas mal plegadas obtenidas.
4. Estudio del entorno de propagación en el mantenimiento de las propiedades bioquímicas y biológicas de las proteínas mal plegadas obtenidas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Construcción del plásmido de expresión de la proteína del prion murina

La generación de la proteína del prion recombinante (recPrP) murina se realizó mediante la utilización de vectores plasmídicos especializados en la expresión de genes, incorporados mediante técnicas de biología molecular; en este caso, los vectores pOPIN desarrollados por *Oxford Protein Production Facility UK* (OPPF). Los vectores pOPIN están diseñados para la clonación mediante recombinación homóloga, concretamente mediante el método de clonación *In Fusion*, que permite una alta expresión de la proteína clonada (Berrow et al., 2007). Se seleccionó el vector pOPIN E, basado en el vector pTriEx2 y cuyas principales características son la de contener el gen de resistencia al antibiótico ampicilina, la presencia de un *enhancer* (del inglés, potenciador) híbrido de Citomegalovirus (CMV), del promotor de β -actina que permite la expresión de proteínas eucariotas en bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) y de una diana para la carboxi-peptidasa A seguida de una cola de 6 Histidinas en el extremo C-terminal de la proteína de interés para su posterior purificación mediante cromatografía de afinidad. Por otra parte, también se utilizó el vector pOPIN F cuya única diferencia respecto al anterior es la presencia de la cola de 6 Histidinas en el extremo N-terminal a la que le sigue una diana para la proteasa 3C procedente del rinovirus humano.

El vector pOPIN E se digirió con las enzimas de restricción NcoI y PmeI (*New England Laboratories*) siguiendo el protocolo especificado por OPPF (*A Guide to using the OPPF pOPIN Vector suite for HTP In-Fusion Cloning*), mientras que el pOPIN F se digirió con las enzimas KpnI y HindIII siguiendo igualmente el protocolo mencionado anteriormente. Las bandas de ADN se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) (Pronadisa) y visualizadas mediante tinción con bromuro de etidio (EtBr) 0,1% (p/v) (Sigma-Aldrich). Los fragmentos de 5151 y 5198 pares de bases procedentes del vector pOPIN E y pOPIN F respectivamente se purificaron mediante *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) siguiendo las especificaciones del kit.

Los extremos de la secuencia de la ORF (del inglés *open reading frame*, marco abierto de lectura) del gen de la PrP murina se adecuaron mediante la técnica de *polymerase chain reaction* (PCR, del inglés, reacción en cadena de la polimerasa) para su posterior clonación en los vectores pOPIN E y pOPIN F mediante el método de clonación *In Fusion*. Para ello, los oligonucleótidos se diseñaron teniendo en cuenta las especificaciones señaladas en el protocolo de la OPPF (*A Guide to using the OPPF pOPIN Vector suite for HTP In-Fusion Cloning*). Los oligonucleótidos se diseñaron para contener al menos 15 pares de bases que hibridaban en la secuencia del punto de inserción del vector de clonación con el fin de mejorar la recombinación homóloga. En el oligonucleótido del extremo carboxilo terminal diseñado para la clonación en pOPIN E se introdujo un codón de terminación (TTA) en la posición de la primera Lisina (K) de la cola de histidinas con el fin de evitar la expresión de las mismas y el corte con carboxi-peptidasa A tras la purificación. Debido a la particularidad de las proteínas priónicas que presentan un alto contenido de Histidinas en la zona de las octa repeticiones (OR), la expresión de esta cola de 6 histidinas artificiales resulta

innecesaria. Las secuencias 5' y 3' de los oligonucleótidos utilizados fueron las siguientes (la secuencia en negrita pertenece a la ORF del gen que codifica la PrP):

- Oligonucleótido del extremo amino terminal para la PrP murina en pOPIN E:
AGGAGATATACCATGAAAAAGCGGCCAAAGCCTGAA
- Oligonucleótido del extremo carboxilo terminal para la PrP murina en pOPIN E:
GTGATGGTGATGTTAGGATCTTCTCCCGTCGTAATA
- Oligonucleótido del extremo amino terminal para la PrP murina en pOPIN F:
AAGTTCTGTTTCAGGGCCGAAAAAGCGGCCAAAGCCTGAA
- Oligonucleótido del extremo carboxilo terminal para la PrP murina en pOPIN F:
ATGGTCTAGAAAGCTTTAGGATCTTCTCCCGTCGTAATA

Partiendo del plásmido que contenía la ORF del gen que codifica la PrP murina que se disponían en el laboratorio, se realizó una PCR con la finalidad de amplificar la secuencia de ADN de interés utilizando los oligonucleótidos específicamente diseñados y descritos anteriormente. Los reactivos contenidos en las reacciones de PCR fueron: 2-10 ng de plásmido, 50 ng de cada uno de los oligonucleótidos (Sigma), 1,25 unidades de la enzima polimerasa LongAmp™ Taq DNA Polymerase (New England Biolabs), 10 µl del tampón de reacción 5X LongAmp™ Taq Reaction Buffer (del inglés, tampón) (New England Biolabs), 0,4 µl de dNTP 10 mM (Sigma-Aldrich) y H₂O desionizada (hasta alcanzar un volumen final de reacción de 50 µl). Las condiciones de PCR aplicadas fueron: 1) un ciclo inicial para la activación de la polimerasa mediante calentamiento a 95 °C durante 5 min, 2) 35 ciclos de amplificación y 3) un periodo adicional de 10 min a 72 °C que permite la extensión de los productos de PCR incompletos. Cada ciclo de amplificación consistió en un periodo de desnaturalización a 95 °C durante 20 s, seguido de un periodo de 45 s a 56 °C que facilita la hibridación de los oligonucleótidos con el molde de ADN y finaliza con un periodo de 60 s a 72 °C que permite la polimerización de las nuevas cadenas de ADN. El producto de PCR se almacenó y conservó a 4 °C. Para realizar las PCRs se empleó el termociclador *DNA Engine Peltier Thermal Cycler, PTC-200* (Bio-Rad).

A continuación y siguiendo el protocolo descrito por el proveedor, los productos amplificados mediante PCR se digirieron con la enzima de restricción DpnI (New England Biolabs) para eliminar los fragmentos de ADN metilados procedentes del molde de ADN utilizado en la reacción de PCR. Las muestras digeridas se purificaron mediante *QIAquick PCR purification kit* (Qiagen) siguiendo las especificaciones del kit.

Finalmente, tras la linealización de los vectores pOPIN E y pOPIN F, además de la adecuación de los extremos de los insertos que contienen la ORF del gen de la PrP descritos anteriormente, se realizaron las recombinaciones homólogas necesarias para la clonación de estos fragmentos en el vector. El método de clonación utilizado fue *In Fusion Dry-Down PCR Cloning Kit* (Clontech), siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Para ello y tras determinar las concentraciones del vector y el inserto mediante el equipo *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific), los

reactivos se mezclaron en un ratio molar 2:1 (vector:inserto), concretamente, 150 ng de vector y 45 ng de inserto.

Las clonaciones recombinadas se transformaron en bacterias ultra-competentes *Escherichia coli DH5 XL-Gold®* (Stratagene) siguiendo el protocolo estándar de transformación mediante choque térmico descrito por Inoue y colaboradores (H. Inoue, Nojima, & Okayama, 1990). Todas las colonias bacterianas obtenidas se cultivaron en 2 ml de medio de cultivo Luria Bertoni (LB) (Pronadisa) con 50 µg/ml de ampicilina (Sigma-Aldrich) y se incubaron a 37 °C en agitación toda la noche. Partiendo de estos cultivos, los plásmidos procedentes de colonias bacterianas se purificaron empleando el *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Para verificar que los plásmidos purificados tenían incorporado la ORF del gen de la PrP murina se realizó un análisis de restricción con la enzima de restricción *AvaI* (New England Biolabs) siguiendo el protocolo del fabricante. Finalmente, con el fin de asegurar que los plásmidos obtenidos contenían la secuencia correcta, la ORF del gen de la PrP y los extremos adyacentes se secuenciaron completamente mediante el servicio de secuenciación de Stabvida (www.stabvida.com) empleando el oligonucleótido universal T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3').

De este modo, se generaron los plásmidos pOPIN E y pOPIN F de expresión de proteínas que contenían la ORF del gen de la PrP recombinante murina:

- pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ murino
- pOPIN F PrP₂₃₋₂₃₁ murino

2. Construcción de los plásmidos de expresión de las diferentes PrPs murinas con deleciones

2.1. Selección de las mutaciones

Las PrPs murinas con mutaciones y deleciones se seleccionaron y diseñaron con dos fines diferentes, por una parte estudiar la capacidad de mal plegamiento espontáneo; y por otra estudiar el papel de la región N-terminal tanto en el mal plegamiento espontáneo como en la propagación específica de cepas y en la neurotoxicidad de las mismas. Se realizaron las siguientes construcciones a partir de la PrP murina:

- L108I
- L108I Δ 141-176
- Δ 23-28 L108I
- Δ 23-31 L108I
- Δ 51-90 L108I

2.2. *Diseño de oligonucleótidos*

Con el fin de realizar las construcciones mencionadas anteriormente se diseñaron parejas de oligonucleótidos que permitieran introducir los cambios deseados mediante mutagénesis secuencial en dos pasos (a excepción de la mutación Δ 51-90 L108I que siguió una estrategia basada en el uso de enzimas de restricción descrita en el apartado 2.5). El tamaño de los oligonucleótidos lo determinó el tipo de secuencia existente en las regiones adyacentes a la zona a modificar [aproximadamente 10 pares de bases *upstream* (aguas arriba de la secuencia nucleotídica) y 10 pares de bases *downstream* (aguas abajo de la secuencia nucleotídica) de la mutación]. Mediante este esquema de trabajo se diseñó la secuencia del oligonucleótido *forward* (del inglés, hacia adelante) (F) y la secuencia del oligonucleótido *reverse* (del inglés, reverso) (R) se obtuvo a partir de la secuencia reversa y complementaria en sentido 5'→3' del oligonucleótido *forward*. La selección de los mejores oligonucleótidos posibles se refinó mediante el software libre "Oligo analyzer 3.1" (Integrated DNA Technologies).

En el siguiente esquema se presentan los oligonucleótidos *forward* y *reverse* empleados en la generación de las construcciones anteriormente mencionadas. En la mutación L108I se observa subrayado y en negrita el codón que alberga el cambio aminoacídico:

- L108I F: 5'CCAAAAACCAAC**ATT**AAGCATGTGGCAGGGGC3'
- L108I R: 5'CTGCCACATGCTT**AAT**GTTGGTTTTTGGTTTGC3'
- Δ 23-28 F: 5'TATACCATGGGAGGGTGAACACCGGTGGAAGCC3'
- Δ 23-28 R: 5'CCGGTGTTCCACCCTCCCATGGTATATCTCCTTTGAT3'
- Δ 23-31 F: 5'TATACCATGAACACCGGTGGAAGCCGGTATCCC3'
- Δ 23-31 R: 5'GGCTTCCACCGGTGTTTCATGGTATATCTCCTTTGAT3'
- Δ 141-176 F: 5'GAGCAGGCCCATGATCCATTTGACTGCGTCAATATCACCATCAAG3'
- Δ 141-176 R: 5'CTTGATGGTGATATTGACGCAGTCGAAATGGATCATGGGCCTGCTC3'

2.3. *Mutagénesis secuencial en dos pasos*

Las mutagénesis secuenciales en dos pasos se efectuaron partiendo de los plásmidos pOPIN E y pOPIN F que expresan la PrP₂₃₋₂₃₁ murina. Para llevarlo a cabo, aparte de los oligonucleótidos específicos para cada mutación, se diseñaron dos oligonucleótidos que hibridan con una secuencia del vector pOPIN PrP₂₃₋₂₃₁ murino próxima al gen que codifica la PrP, un oligonucleótido *forward* cerca del extremo amino terminal y un oligonucleótido *reverse* cerca del extremo carboxilo terminal:

Oligonucleótido *forward*: 5'-CCGCGGGGGGACGGCTGCC-3'

Oligonucleótido *reverse*: 5'-GAACAGAGGTGCGTCTGGTG-3'

En un primer paso se realizaron dos PCRs, una de ellas con el oligonucleótido *forward* que contenía la mutación a introducir y el oligonucleótido *reverse* del extremo carboxilo terminal de la secuencia que codifica la PrP; y la otra con el oligonucleótido *forward* del extremo amino terminal de la secuencia que codifica la PrP y el oligonucleótido *reverse* que contiene la mutación. En todos los casos y en esta primera fase, las PCRs empleadas contenían:

- 2 ng de plásmido de pOPIN PrP₂₃₋₂₃₁ murino.
- 50 ng de cada oligonucleótido.
- 1,25 unidades de la enzima polimerasa *Pfu DNA Polymerase* (Fermentas).
- 5 µl del *buffer* 10X para la enzima polimerasa Pfu (20 mM MgSO₄).
- 0,4 µl de dNTP 10 mM.
- H₂O (hasta 50 µl).

Las condiciones de PCR aplicadas fueron: 1) un ciclo inicial de desnaturalización del molde de ADN de partida mediante calentamiento a 95 °C durante 5 min, 2) 40 ciclos de amplificación y 3) un periodo adicional de 10 min a 72 °C que permite la extensión de los productos de PCR incompletos. Cada ciclo de amplificación consistió en un periodo de desnaturalización de 95 °C durante 20 s, seguido de un periodo de 45 s a 56 °C que facilita la hibridación de los oligonucleótidos con el molde de ADN y finaliza con un periodo de 60 s a 72 °C que permite la polimerización de las nuevas cadenas de ADN. Los productos de PCR se almacenaron y conservaron a 4 °C.

Como resultado de esta primera fase se obtuvieron dos fragmentos de ADN, que contenían cada uno de ellos una parte de la ORF del gen que codifica la PrP murina con la mutación de interés. La purificación de los mismos se llevó a cabo mediante la utilización del kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante (*QIAquick® Spin Handbook*).

El segundo paso de la mutagénesis dirigida consistió en la reconstitución completa de la ORF del gen que codifica la PrP murina que contenía la mutación de interés. Para ello se realizó de nuevo una PCR empleando como moldes los dos fragmentos obtenidos en el paso anterior y los oligonucleótidos *forward* que hibrida cerca del extremo amino terminal y *reverse* que hibrida cerca del carboxilo terminal de la ORF del gen que codifica la PrP.

Las PCRs empleadas contenían:

- 50-100 ng fragmentos de ADN purificados de la primera fase.
- 50 ng de cada oligonucleótido.
- 1,25 unidades de la enzima polimerasa *Pfu DNA Polymerase* (Fermentas).
- 5 µl del *buffer* 10X para la enzima polimerasa Pfu (20 mM MgSO₄).
- 0,4 µl de dNTP 10 mM.
- H₂O (hasta 50 µl).

Las condiciones de PCR aplicadas fueron idénticas a las empleadas en el primer paso. Los fragmentos amplificados se purificaron con *GeneJet PCR Purification Kit* (Fermentas) siguiendo el protocolo del fabricante.

2.4. Clonación de las ORFs del gen que codifica para las diferentes PrPs murinas con deleciones en el vector de expresión de proteínas pOPIN E

Con el fin de ligar los distintos fragmentos de ADN generados en el apartado anterior en el vector de expresión pOPIN E, se llevaron a cabo digestiones con enzimas de restricción y purificaciones que se detallan a continuación.

Los fragmentos de ADN que codifican las PrPs murinas se digirieron con la enzima de restricción XbaI (Fermentas) y posteriormente, tras realizar una purificación con *GeneJet PCR Purification Kit* (Fermentas), se digirieron con la enzima de restricción PstI (Fermentas), siguiendo las especificaciones del fabricante. La enzima de restricción XbaI reconoce una secuencia de ADN ubicada en el vector cerca del extremo amino terminal de la secuencia de la ORF del gen que codifica la PrP₂₃₋₂₃₁ murina, mientras que PstI digiere en una zona del vector cercana al extremo carboxilo terminal, dando lugar a los siguientes fragmentos dependiendo de la mutación con la que se trabaje:

- L108I: 1074 pares de bases
- Δ23-28: 1056 pares de bases
- Δ23-31: 1047 pares de bases
- Δ141-176: 966 pares de bases

Para la selección de enzimas de restricción mencionadas se utilizó el software libre "NEBcutter V2.0" (New England Biolabs). Los fragmentos digeridos se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v), tinción con RedSafe™ (iNtRON Biotechnology) 0,1% (p/v) y *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen), siguiendo el protocolo del fabricante.

El plásmido pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ murino se digirió con las enzimas de restricción XbaI y PstI, siguiendo el procedimiento mencionado anteriormente. Los fragmentos de 4707 pares de bases se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, tinción con RedSafe™ (iNtRON Biotechnology) 0,1% y *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante.

Los fragmentos correspondientes a las secuencias de las ORFs del gen que codifica para las PrPs murinas mutadas se clonaron en el vector pOPIN E murino obtenido en el paso anterior. Para ello, el plásmido y el inserto se mezclaron a un ratio molar de 3:1 (inserto:vector) y se ligaron con la enzima *T4 DNA ligasa* (Fermentas) incubando la mezcla de reacción a 16 °C, como indica el protocolo del fabricante. Los productos de la ligación se transformaron en bacterias ultra-competentes *E. coli DH5 XL-Gold®* (Stratagene) siguiendo el protocolo estándar de transformación por choque térmico. De cada transformación se seleccionaron 4-6 colonias bacterianas y los

plásmidos procedentes de estas colonias bacterianas se purificaron mediante *GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Para verificar que los plásmidos purificados tenían incorporado la ORF del gen que codifica la PrP, se realizó un análisis de restricción con las enzimas XbaI (Fermentas) y PstI (Fermentas) siguiendo el protocolo de la casa comercial. Finalmente, con el fin de asegurar que los plásmidos obtenidos contenían la mutación deseada, la ORF del gen que codifica la PrP se secuenció completamente mediante el servicio de secuenciación de Stabvida con el oligonucleótido universal T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'). A continuación se listan los plásmidos generados mediante la metodología detallada:

- pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ L108I
- pOPIN E PrP_{Δ23-28} L108I
- pOPIN E PrP_{Δ23-31} L108I
- pOPIN E PrP_{Δ141-176} L108I

Todas las demás mutaciones son derivadas de la secuencia de nucleótidos Δ51-90 L108I por lo que se encuentran descritas y definidas en el apartado 3.

2.5. Mutagénesis basada en el uso de enzimas de restricción

Para llevar a cabo la construcción PrP_{Δ51-90} L108I se partió del vector pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ murino con la mutación puntual L108I. En primer lugar, el vector se digirió con la enzima de restricción XmaI (Fermentas) y posteriormente, tras realizar una purificación con *GeneJet PCR Purification Kit* (Fermentas), se digirió con la enzima Acc65I (Fermentas), en todos los casos siguiendo las recomendaciones y especificaciones del fabricante. La enzima de restricción XmaI reconoce una secuencia de ADN ubicada en el extremo amino terminal de la secuencia que codifica la PrP₂₃₋₂₃₁ murina (concretamente 12 aminoácidos antes de la región de las octarepeticiones), mientras que Acc65I digiere justamente dos aminoácidos después de las octarepeticiones. Estos cortes dan lugar a un fragmento de 162 pares de bases, de las cuales 120 pertenecen a las 5 octarepeticiones que presenta la PrP murina. Debido a que estos dos cortes eliminan nucleótidos que nos interesan conservar dado que no pertenecen a la secuencia de las octarepeticiones (solamente esta región es la que es necesario deletar) y que su eliminación daría lugar a un corrimiento en el marco de lectura, se diseñaron los siguientes dos oligonucleótidos con los codones correspondientes a los aminoácidos que se habían eliminado y flanqueados por los sitios de corte correspondientes a las enzimas XmaI y Acc65I:

- Oligo F: 5'CCGGGCAGGGAAGCCCTGGAGGCAACCGTTACCCAGGAGGGG3'
- Oligo R: 5'GTACCCCTCTGGGTAACGGTTGCCTCCAGGGCTTCCCTGC3'

La estrategia a seguir para la hibridación y ligación de estos oligonucleótidos se basó primeramente en tener en cuenta qué cantidad de ADN se necesitaría para que el ratio entre

plásmido e inserto fuera 3:1 (inserto:vector), después se llevó a cabo la hibridación de los dos oligonucleótidos de forma equimolar. El programa de temperaturas que se utilizó para desnaturalizar e hibridar de forma complementaria las dos cadenas consistió en un choque térmico de 90 °C durante 1 min para desnaturalizar el ADN, seguido de 70 °C durante 5 min para favorecer la hibridación por complementariedad de forma gradual y lenta, acabando a 42 °C durante el periodo de tiempo de 5 minutos. Como resultado, se obtuvo la hibridación de los oligos complementarios que dejaron las secuencias de corte de las enzimas XmaI y Acc65I en los extremos. El inserto se digirió con la enzima de restricción XmaI (Fermentas) y posteriormente, tras realizar una purificación con *GeneJet PCR Purification Kit* (Fermentas), se digirió con la enzima Acc65 (Fermentas), en todos los casos siguiendo las recomendaciones y especificaciones del fabricante. Para la elección de las enzimas de restricción mencionadas se utilizó el software libre “NEBcutter V2.0” (New England Biolabs). Los fragmentos digeridos se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v), tinción con RedSafe™ (iNtRON Biotechnology) 0,1% (p/v) y *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen), siguiendo el protocolo del proveedor.

Por otro lado, puesto que el corte con XmaI está impedido, dado que es una enzima sensible a metilación de las citosinas de las regiones CpG, los plásmidos pOPIN E que contienen la secuencia que codifica la PrP₂₃₋₂₃₁ L108I murina se transformó en bacterias competentes *E. coli* HST08 *Stellar™* (*dam-/dcm-*) (Clontech). La transformación se realizó siguiendo el protocolo estándar de transformación por choque térmico. Los plásmidos procedentes de todas las colonias bacterianas obtenidas se purificaron empleando el *GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Para verificar que los plásmidos purificados tuvieran la PrP mutada se efectuó una electroforesis en gel de agarosa al 1% y tinción con RedSafe™ (iNtRON Biotechnology) 0,1% (p/v).

El inserto generado previamente se clonó en el vector pOPIN E utilizando los mismos cortes en el proceso. Para ello, el plásmido y el inserto se mezclaron en un ratio molar 3:1 (inserto:vector) y se ligaron con la enzima *T4 DNA ligasa* (Fermentas) incubando la mezcla de reacción a 16 °C, como indica el protocolo del proveedor. Los productos de la ligación se transformaron en bacterias ultra-competentes *E. coli* *DH5 XL-Gold®* (Stratagene) siguiendo el protocolo estándar de transformación por choque térmico. De cada transformación se seleccionaron 4-6 colonias bacterianas y los plásmidos procedentes de estas colonias bacterianas se purificaron mediante *GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas) siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial. Para verificar que los plásmidos purificados tenían incorporado la ORF del gen que codifica la PrP se realizó un análisis de restricción con las enzimas de restricción XbaI (Fermentas) y PaeI (Fermentas) siguiendo el protocolo del fabricante. Finalmente, con el fin de asegurar que los plásmidos obtenidos contenían la mutación deseada, la ORF del gen que codifica la PrP se secuenció completamente mediante el servicio de secuenciación de Stabvida con el oligonucleótido universal T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'). A continuación se lista el plásmido generado mediante la metodología detallada:

- pOPIN E PrP Δ_{51-90} L108I

El vector pOPIN E (como ya se ha explicado anteriormente) no posee histidinas artificiales y la mutación Δ_{51-90} las demanda para poder ser purificada, por lo que se decidió utilizar el vector pOPIN F que además presenta las histidinas artificiales en el extremo N-terminal donde deben posicionarse para evitar que interfieran con el mal plegamiento de la proteína.

Para llevar a cabo esta nueva estrategia se utilizó el vector pOPIN F PrP $_{23-231}$ murino, el cual posee la cola de 6 Histidinas en el extremo N-terminal a la que le sigue una diana para la proteasa 3C procedente del rinovirus humano. Las enzimas de restricción utilizadas fueron XmaI (Fermentas) con un sitio de corte N-terminal y anterior a las zonas de las octarepeticiones, y con PstI (Fermentas) cuya diana se encuentra en los nucleótidos posteriores a la mutación L108I. De la misma forma, el vector pOPIN E PrP Δ_{51-90} L108I se cortó con las enzimas XmaI y PstI generando un inserto de 417 pares de bases. Los fragmentos de 5364 y 417 pares de bases se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, tinción con RedSafe™ (iNtRON Biotechnology) 0,1% y QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante.

El inserto se clonó en el vector pOPIN F previamente generado con los sitios de corte compatibles con el inserto, se ligó y transformó siguiendo el protocolo anteriormente descrito. De cada transformación se seleccionaron 4-6 colonias bacterianas y los plásmidos procedentes de estas colonias bacterianas se purificaron mediante GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Para verificar que los plásmidos purificados tenían incorporado la secuencia que codifica la PrP se realizó un análisis de restricción con las enzimas de restricción XbaI (Fermentas) y PstI (Fermentas). Finalmente, con el fin de asegurar que los plásmidos obtenidos contenían la mutación deseada, la ORF del gen que codifica la PrP se secuenció completamente mediante el servicio de secuenciación de Stabvida con el oligonucleótido universal T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'). A continuación se muestra el plásmido generado mediante la metodología detallada:

- pOPIN F PrP Δ_{51-90} L108I

3. Construcción de los plásmidos de expresión de las PrPs con deleciones derivadas del vector pOPIN F PrP Δ_{51-90} L08I

3.1. Selección de las mutaciones

Con la idea de estudiar el efecto sobre la capacidad de mal plegamiento que puedan tener deleciones en otras regiones de la proteína, aparte de las que se pueden observar en el apartado 2.1, se decidió hacer las siguientes mutaciones derivadas del plásmido pOPIN F PrP Δ_{51-90} L108I:

- Δ_{90} L108I
- Δ_{51-90} L108I $\Delta_{141-176}$

- Δ90 L108I Δ141-176

3.2. Diseño de oligonucleótidos

Con el fin de realizar las construcciones mencionadas anteriormente se diseñaron parejas de oligonucleótidos que permitieran introducir los cambios deseados mediante mutagénesis secuencial en dos pasos. El tamaño de los oligonucleótidos lo determinó la secuencia de la región adyacente a la zona a modificar (aproximadamente 10 pares de bases *upstream* y 10 pares de bases *downstream* de la mutación). Mediante este esquema de trabajo se diseñó la secuencia del oligonucleótido *forward* y la secuencia del oligonucleótido *reverse* se obtuvo a partir de la secuencia reversa y complementaria del oligonucleótido *forward*. La selección de los mejores oligonucleótidos posibles se refinó mediante el software libre "Oligo analyzer 3.1" (Integrated DNA Technologies).

En el siguiente esquema se presentan los oligonucleótidos *forward* y *reverse* empleados en la generación de las mutaciones anteriormente mencionadas.

- Δ90 F: 5'TTTCAGGGCCCGGGAGGGGGTACCCATAAT3'
- Δ90 R: 5'GGTACCCCTCCCGGGCCCTGAAACAGAAC3'
- Δ141-176 F: 5'GAGCAGGCCCATGATCCATTTTCGACTGCGTCAATATCACCATCAAG3'
- Δ141-176 R: 5'CTTGATGGTGATATTGACGCAGTCGAAATGGATCATGGGCCTGCTC3'

3.3. Mutagénesis secuencial en dos pasos

Partiendo del plásmido pOPIN F PrP_{Δ51-90} L108I murino se efectuaron las mutagénesis secuenciales en dos pasos, en las que se generaron primero las construcciones PrP_{Δ90} L108I y PrP_{Δ51-90} Δ141-176 L108I y posteriormente a partir de la secuencia nucleotídica de la PrP_{Δ90} L108I se obtuvo la PrP_{Δ90} Δ141-176 L108I. Para llevarlo a cabo, aparte de los oligonucleótidos específicos para cada mutación, se diseñaron dos oligonucleótidos que hibridan con una secuencia del vector pOPIN F PrP₂₃₋₂₃₁ murino próxima a la ORF del gen que codifica la PrP, un oligonucleótido *forward* cerca del extremo amino terminal y un oligonucleótido *reverse* cerca del extremo carboxilo terminal:

Oligonucleótido *forward*: 5'-CCGCGGGGGGACGGCTGCC-3'

Oligonucleótido *reverse*: 5'-GAACAGAGGTGCGTCTGGTG-3'

En un primer paso se realizaron dos PCRs, una de ellas con el oligonucleótido *forward* que contenía la mutación a introducir y el oligonucleótido *reverse* del extremo carboxilo terminal de la secuencia que codifica la PrP; y la otra con el oligonucleótido *forward* del extremo amino terminal de la secuencia que codifica la PrP y el oligonucleótido *reverse* que contiene la mutación. En todos los casos y en esta primera fase, las PCRs empleadas contenían:

- 2 ng de plásmido de pOPIN PrP₂₃₋₂₃₁ murino.
- 50 ng de cada oligonucleótido.
- 1,25 unidades de la enzima polimerasa *Pfu DNA Polymerase* (Fermentas).
- 5 µl del *buffer* 10X para la enzima polimerasa Pfu (20 mM MgSO₄).
- 0,4 µl de dNTP 10 mM.
- H₂O (hasta 50 µl).

Las condiciones de PCR aplicadas fueron las descritas previamente en el apartado 2.3.

Como resultado de esta primera fase se obtuvieron dos fragmentos de ADN, que contenían cada uno de ellos una parte de la ORF del gen que codifica la PrP murina con la mutación de interés. La purificación de los mismos se llevó a cabo mediante la utilización del kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante (*QIAquick® Spin Handbook*).

El segundo paso de la mutagénesis dirigida consistió en la reconstitución completa de la ORF del gen que codifica la PrP murina que contenía la mutación de interés. Para ello se realizó de nuevo una PCR empleando como moldes los dos fragmentos obtenidos en el paso anterior y los oligonucleótidos *forward* que hibrida cerca del extremo amino terminal y *reverse* que hibrida cerca del carboxilo terminal del gen que codifica la PrP.

En todos los casos y en esta última fase, las PCRs empleadas contenían:

- 50-100 ng fragmentos de ADN purificados de la primera fase.
- 50 ng de cada oligonucleótidos.
- 1,25 unidades de la enzima polimerasa *Pfu DNA Polymerase* (Fermentas).
- 5 µl del *buffer* 10X para la enzima polimerasa Pfu (20 mM MgSO₄).
- 0,4 µl de dNTP 10 mM.
- H₂O (hasta 50 µl).

Las condiciones de PCR aplicadas fueron idénticas a las empleadas en el primer paso. Los fragmentos amplificados se purificaron con *GeneJet PCR Purification Kit* (Fermentas) siguiendo el protocolo del fabricante.

3.4. Clonación de los genes que contienen las diferentes mutaciones murinas derivadas del vector *pOPIN F PrP₅₁₋₉₀ L108I* en el vector de expresión de proteínas *pOPIN F*

Con el fin de ligar los distintos fragmentos de ADN codificantes generados en el apartado anterior en el vector de expresión *pOPIN F*, se llevaron a cabo digestiones con enzimas de restricción y purificaciones que se detallan a continuación.

Los fragmentos de ADN que codifican las PrPs murinas se digirieron con la enzima de restricción *XbaI* (Fermentas) y tras realizar una purificación con *GeneJet PCR Purification Kit*

(Fermentas), se digirieron con la enzima de restricción *PagI* (Fermentas) siguiendo las especificaciones del fabricante. La enzima de restricción *XbaI* reconoce una secuencia de ADN ubicada en el vector cerca del extremo amino terminal de la secuencia del gen que codifica la PrP₂₃₋₂₃₁ murina, mientras que *PagI* digiere en una zona del vector cercana al extremo carboxilo terminal, dando lugar a los siguientes fragmentos dependiendo de la mutación con la que estemos trabajando:

- $\Delta 90$ L108I: 926 pares de bases
- $\Delta 51-90$ L108I $\Delta 141-176$: 900 pares de bases
- $\Delta 90$ L108I $\Delta 141-176$: 817 pares de bases

Para la selección de enzimas de restricción mencionadas se utilizó el software libre "NEBcutter V2.0" (New England Biolabs). Los fragmentos digeridos se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v), tinción con RedSafe™ (iNtRON Biotechnology) 0,1% (p/v) y *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen), siguiendo el protocolo del fabricante.

El plásmido pOPIN F PrP₂₃₋₂₃₁ murino se digirió con las enzimas de restricción *XbaI* y *PagI*, siguiendo el procedimiento mencionado anteriormente. Los fragmentos de 4707 pares de bases correspondientes al vector se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, tinción con RedSafe™ (iNtRON Biotechnology) 0,1% y *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante.

Los fragmentos correspondientes a las secuencias de los genes que codifican las PrPs murinas mutadas se clonaron en el vector pOPIN F de ratón obtenido en el paso anterior. Para ello, el plásmido y el inserto se mezclaron a un ratio molar de 3:1 (inserto:vector) y se ligaron mediante la enzima *T4 DNA ligasa* (Fermentas) incubando la mezcla de reacción a 16 °C, como indica el protocolo del fabricante. Los productos de la ligación se transformaron en bacterias ultra-competentes *E. coli DH5 XL-Gold®* (Stratagene) siguiendo el protocolo estándar de transformación por choque térmico. De cada transformación se seleccionaron 4-6 colonias bacterianas y los plásmidos procedentes de estas colonias bacterianas se purificaron mediante *GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Para verificar que los plásmidos purificados tenían incorporado la ORF del gen que codifica la PrP se realizó un análisis de restricción con las enzimas de restricción *XbaI* (Fermentas) y *PagI* (Fermentas) siguiendo el protocolo del fabricante. Finalmente, con el fin de asegurar que los plásmidos obtenidos contenían la mutación deseada, la ORF del gen que codifica la PrP se secuenció completamente mediante el servicio de secuenciación de Stabvida con el oligonucleótido universal T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'). A continuación se listan los plásmidos generados mediante la metodología detallada:

- pOPIN F PrP $\Delta 90$ L108I
- pOPIN E PrP $\Delta 51-90 \Delta 141-176$ L108I

- pOPIN E PrP_{Δ90 Δ141-176} L108I

4. Generación de las proteínas recombinantes

4.1. Transformación de plásmidos en bacterias mediante choque térmico

Para poder producir las proteínas recombinantes de las diversas PrPs delecionadas a partir de los plásmidos de expresión pOPIN E y pOPIN F generados previamente, los vectores se transformaron en bacterias supercompetentes *E. coli* Rosetta (DE3)[™] (EMD Millipore), desarrolladas para la sobreexpresión de proteínas eucarióticas que contienen codones raramente usados en *E. coli*. Los plásmidos pOPIN E se transformaron específicamente en estas bacterias mediante el protocolo estándar de transformación por choque térmico (H. Inoue et al., 1990) y conservadas a -80 °C en medio LB:glicerol 4:1 (v/v).

4.2. Expresión de las proteínas recombinantes

Las bacterias Rosetta (DE3) transformadas con los plásmidos de interés se cultivaron en 2 litros de medio Luria Bertani (LB) (Lennox) en presencia de ampicilina a una concentración de 20 µg/ml (Sigma-Aldrich) e incubadas a 37 °C en agitación a 200 rpm (Agitador Orbital SSL1, Stuart) hasta alcanzar una densidad óptica en la longitud de onda de 600 nm (DO₆₀₀) de 0,6 - 0,8. Con el fin de inducir la síntesis de la proteína de expresión en las bacterias cultivadas, se añadió al cultivo bacteriano Isopropil-β-D-1-tiogalactopirósido (IPTG) (Gold Biotechnology) a una concentración final de 1 mM y se mantuvo durante 3 horas más en las condiciones de temperatura y agitación descritas anteriormente.

La inducción de proteína recombinante mediada por la adición de IPTG se finalizó con la incubación de los cultivos bacterianos en hielo durante 15 min. Finalmente, las bacterias se centrifugaron durante 15 min a una velocidad de 4500 *g* y a una temperatura de 4 °C (Centrífuga Sorvall Legend XTR, Thermo Scientific).

El precipitado bacteriano se resuspendió en 50 ml de *buffer* de lisis [50 mM tris(hidroximetil)aminometano hidrocloreto Tris-HCl (Fisher Bioreagents), 5 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Sigma-Aldrich), 1% Triton X-100 (Amresco), 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma-Aldrich), 100 µg/ml Lisozima (Sigma-Aldrich), pH ajustado a 8.0] y a continuación se incubó durante 30 min en agitación a 200 rpm a temperatura ambiente en presencia de 100 U/ml de deoxyribonucleasa (DNAsa) (Sigma-Aldrich) y 20 mM de cloruro de magnesio (MgCl₂) (Sigma-Aldrich). El lisado se centrifugó a 4 °C durante 1 h a 8.500 *g* (Centrífuga Sorvall ST 16R, Thermo Scientific) y el material precipitado obtenido se resuspendió en 50 ml de *buffer* de lavado [20 mM Tris-HCl (Fisher Bioreagents), 150 mM cloruro de sodio (NaCl) (Sigma-Aldrich), 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich), 1% Sarkosyl (Sigma-Aldrich), pH ajustado a 8.0]. De nuevo, el lisado se centrifugó en las condiciones descritas anteriormente y el material precipitado se disolvió en 6 ml de *buffer* de inclusión [20 mM Tris-HCl (Fisher Bioreagents), 0,5 M NaCl (Sigma-

Aldrich), 6 M cloruro de guanidinio (Fisher Scientific), pH ajustado a 8.0] e incubó a 37 °C en agitación durante toda la noche con el fin de disolver los cuerpos de inclusión y solubilizar en el medio la proteína recombinante de interés. A continuación, las muestras se centrifugaron a 4 °C durante 1 hora a 8.500 *g* y los sobrenadantes se filtraron a través de un tamaño de poro de 0,20 µm (Minisart, Sartorius Stedim) antes de su purificación.

4.3. Purificación de las proteínas recombinantes

Este procedimiento está basado en el empleo de columnas *HisTrap FF Crude 5 ml* (GE Healthcare Amersham). En primer lugar tras equilibrar las columnas con 35 ml de *buffer* de unión [20 mM Tris-HCl (Fisher Bioreagents), 500 mM NaCl (Sigma-Aldrich), 5 mM Imidazol (Sigma-Aldrich), 2 M cloruro de guanidinio (Fisher Scientific), pH ajustado 8.0], la muestra filtrada que contenía la PrP recombinante soluble se cargó en la columna mediante la utilización de agujas de calibre de 22 G y longitud de 1 ¼ pulgadas (Terumo). La columna se lavó con 75 ml de *buffer* de unión y las proteínas recombinantes eluidas con 30 ml de *buffer* de elución [20 mM Tris-HCl (Fisher Bioreagents), 500 mM NaCl (Sigma-Aldrich), 500 mM Imidazol (Sigma-Aldrich), 2 M cloruro de guanidinio (Fisher Scientific), pH ajustado a 8.0]. Las proteínas eluidas se denaturalizaron mediante la adición de cloruro de guanidinio (Sigma-Aldrich) hasta una concentración final de 6 M y posteriormente se concentraron a una concentración de 4-5 mg/ml mediante unidades de filtros de centrifugación de 10 KDa, (*Amicon Ultra-15 10KDa Centrifugal filter unit*, Millipore). Finalmente, las proteínas recombinantes generadas se almacenaron a -80 °C.

La calidad y pureza de las proteínas recombinantes obtenidas se evaluó mediante tinción de Coomassie tras electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) en geles *Criterion TGX 4-15%* (Bio-Rad) de 1-5 µg de la proteína recombinante. 10 µl de muestra de la elución de la proteína recombinante se precipitó añadiendo 56,7 µl de metanol frío (Fisher Chemical) y tras centrifugar durante 30 min a una velocidad de 19.000 *g* y a 4 °C de temperatura (Centrífuga Sorvall ST 16R, Thermo Scientific), el material precipitado se resuspendió en 16 µl de *buffer NuPAGE* (Invitrogen Life Technologies) y cargó en el gel de electroforesis. El gel se incubó durante una hora en *buffer* de tinción de Coomassie [3 g Coomassie Brilliant Blue®, Serva), 450 ml metanol (Fisher chemical), 50 ml ácido acético glacial (Fisher chemical) y 450 ml de H₂O destilada]. La decoloración del mismo se realizó con el *buffer* que contenía 200 ml metanol, 50 ml ácido acético glacial y 250 ml H₂O destilada, cambiando el *buffer* cada 30 min durante aproximadamente tres horas.

5. Preparación de sustratos para PMCA

La propagación *in vitro* de priones se realizó basándose en el procedimiento de amplificación cíclica de proteínas anormalmente plegadas (PMCA, del inglés *Protein Misfolding Cyclic Amplification*) descrito por Castilla y colaboradores (Castilla, Saa, Hetz, et al., 2005; Saa et al.,

2006b; Saborio et al., 2001) que permite propagar priones *in vitro* mimetizando el proceso de propagación *in vivo*, pero con una cinética más acelerada (Saborio et al., 2001).

Se prepararon distintos tipos de sustratos basados en la proteína del prion los cuales presentan diferentes características dependiendo de la finalidad de cada estudio. Los sustratos utilizados a lo largo de este trabajo fueron: sustratos basados en homogeneizados completos de encéfalo, sustratos basados en PrP recombinante complementada con homogeneizado de encéfalo y sustratos basados en PrP recombinante complementada con dextrano sulfatado. Durante todo el proceso de la preparación de estos sustratos, todos los componentes han sido mantenidos a 4 °C con el fin de minimizar el deterioro de los mismos. Tras haber preparado los sustratos, estos se conservaron a -80 °C en alícuotas idóneas para evitar ciclos de congelación-descongelación, dado que este proceso favorece la degradación del sustrato.

5.1. Sustratos basados en homogeneizados completos de encéfalo

Los encéfalos de ratones se extrajeron tras sacrificar los animales mediante inhalación de dióxido de carbono y tras ser perfundidos mediante punción cardiaca con 50 ml de *buffer* de perfusión [PBS (HyClone sin iones de Ca y Mg) y 5 mM EDTA (Sigma-Aldrich)]. El objetivo de este procedimiento es el de eliminar restos de sangre que pudieran afectar negativamente tanto al proceso de amplificación de priones, como al tratamiento posterior con proteinasa K (PK). La homogenización se llevó a cabo con la ayuda de un homogeneizador de tejidos Elvehjem de 15 ml (Fisherbrand), empleando *buffer* de conversión (CB, del inglés *conversion buffer*) frío [PBS (Fisher BioReagents), 150 mM NaCl (Sigma-Aldrich), 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich), 4 mM EDTA (Sigma-Aldrich), inhibidores de proteasas *Complete™ Cocktail 1X* (Roche)] al 10% (p/v). La muestra se mantuvo a 4 °C a lo largo de todo el proceso. Se utilizó la línea de ratón transgénico TgMoL108I que expresa 3-4 veces la PrP^C murina con la mutación puntual L108I sobre un fondo genético *Prnp^{0/0}*.

5.2. Sustratos basados en PrP recombinante complementada con homogeneizado de encéfalo

Las proteínas recombinantes purificadas a través de columnas de afinidad (apartado 4.3) se diluyeron 1:5 en PBS (Fisher Bioreagents) y dializaron frente a PBS durante 1 h a 4 °C empleando casetes de diálisis de 10 KDa (*Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette 10K MWCO*, Thermo Scientific). Con el fin de eliminar la proteína insoluble anormalmente plegada como consecuencia del proceso de diálisis, las muestras se centrifugaron a 19.000 *g* durante 15 min a 4 °C (Centrífuga Sorvall ST 16R, Thermo Scientific) y se recogió el sobrenadante que contenía la proteína soluble.

Con el objetivo de complementar los sustratos con factores que fomentan la propagación de priones se emplearon encéfalos de ratones transgénicos carentes de PrP [ratones transgénicos *Prnp^{0/0}* (Bueler et al., 1992)] o encéfalos procedentes de pollo (*Gallus gallus domesticus*), cuya proteína PrP no interfiere en el fenómeno de amplificación de priones por no ser mal plegada. El uso de sustratos basados en encéfalo de pollo, responde a la observación de que presenta una

mayor eficiencia en la propagación por dilución seriada de semillas que los sustratos complementados con encéfalo de ratón *Prnp^{0/0}*, reservándose su uso para los estudios de dilución principalmente.

En el caso de la utilización de encéfalos de ratones transgénicos *Prnp^{0/0}*, tras el sacrificio de los animales, los encéfalos se perfundieron con el *buffer* de perfusión tal y como se describe en el apartado 5.1. En el caso de los encéfalos de pollo, tras el sacrificio del animal se realizó un lavado del tejido en el *buffer* de perfusión, eliminando la mayor fracción de sangre posible. Los encéfalos obtenidos se homogeneizaron al 10% (p/v) en *buffer* de conversión manteniendo la muestra a 4 °C a lo largo de todo el proceso. Con el fin de eliminar restos de tejido no homogeneizados correctamente la muestra se centrifugó a 19.000 *g* durante 15 min a 4 °C (Centrífuga Sorvall ST 16R, Thermo Scientific) y el precipitado se descartó.

Finalmente la proteína recombinante PrP previamente cuantificada por *BCA Protein Assay* (Thermo-Pierce)) para conseguir una concentración final aproximada de 50-100 ng/μl, se mezcló para su complementación con el homogenizado de encéfalo en una proporción volumétrica de 1:10 (proteína recombinante:encéfalo).

5.3. Sustratos basados en PrP recombinante complementados con dextrano sulfatado

Las proteínas recombinantes purificadas a través de columnas de afinidad (apartado 4.3) se dializaron y centrifugaron en las mismas condiciones a las descritas en el apartado 5.2. La proteína recombinante se diluyó en una proporción volumétrica de 1:10 en CB y complementó con dextrano sulfatado (peso molecular ~6.000-10.000, Sigma-Aldrich) a una concentración final de 0,5%.

6. Propagación *in vitro* de priones a través del uso de PMCA

Todos los experimentos de PMCA se llevaron a cabo utilizando tubos eppendorf de 0,2ml y de pared fina (Fisherbrand) para favorecer una penetración más efectiva de las ondas ultrasónicas y en un volumen final de 50 μl.

El modelo de sonicador utilizado y los parámetros empleados durante la sonicación fueron específicos en función del tipo de sustrato que se empleó para la propagación de priones *in vitro*:

Sustratos basados en PrP de origen recombinante: se utilizó el sonicador Misonix Q-700 con sistema de microplaca (Qsonica) programado para llevar a cabo ciclos de 30 minutos de incubación, seguidos de pulsos de sonicación de 15 s a una potencia de 50-60%. Todo el proceso se llevó a cabo a una temperatura media de 39 °C regulada mediante un baño de agua circulante.

Sustratos basados en PrP^C de origen mamífero: se utilizó el sonicador Misonix S-4000 con sistema de microplaca (Qsonica) programado para efectuar ciclos de 30 minutos de incubación,

seguidos de pulsos de 20 s de sonicación a una potencia de 80%. Todo el proceso se llevó a cabo a una temperatura media de 37 °C regulada mediante un baño de agua circulante.

Durante el desarrollo de la presente tesis doctoral se ha empleado la técnica de la PMCA con distintos objetivos, introduciendo variables características que se describirán a continuación:

1) Rondas seriadas de PMCA

a) *Para generación espontánea de priones (recPMCA sin semilla)*

El objetivo de esta metodología es la generación de priones espontáneos en ausencia de semilla de prion que contribuyan al estudio de los priones de origen esporádico. Este proceso se llevó a cabo mediante rondas seriadas de PMCA de 24 h. En cada nueva ronda de PMCA se realizaron diluciones 1:10 del producto en sustrato fresco y el procedimiento se repitió hasta un total de 10-30 rondas de PMCA. Para este estudio se utilizaron proteínas recombinantes complementado con cerebro *Prnp^{0/0}* o con dextrano 0,5%.

b) *Para evaluar barrera de transmisión (recPMCA con semilla)*

El proceso empleado se basó en el uso seriado de rondas de PMCA en las que cada 24 h, el material sonicado se diluyó 1:10 en sustrato fresco. El proceso se repitió hasta un máximo de 24 rondas de PMCA.

c) *Para evaluar infectividad in vitro (brainPMCA)*

Con el fin de evaluar *in vitro* la potencial capacidad infectiva de una proteína mal plegada obtenida tras la consecución de alguno de los procedimientos anteriores, se realizaron estudios de brainPMCA. Para ello, la proteína mal plegada recombinante se utilizó como semilla para inducir el mal plegamiento de la PrP^C contenida en sustratos basados en homogeneizados de encéfalo de transgénicos TgL108I. El procedimiento se realizó de forma seriada donde tras cada ronda de 24 h de PMCA se realizó una dilución 1:10 del producto de la primera ronda de PMCA en sustrato fresco. El proceso se repitió hasta un máximo de 5 rondas de PMCA.

2) Evaluación de la capacidad de propagación mediante dilución seriada

Una de las principales características de los priones es su capacidad de propagar su mal plegamiento a expensas de la misma PrP en conformación nativa. Para comprobar si las proteínas recombinantes mal plegadas presentan esta capacidad se llevaron a cabo PMCA en las que se utilizaron como semillas diluciones seriadas de las proteínas mal plegadas en estudio (desde 10⁻¹ a 10⁻¹²). La capacidad de propagación se evaluó a través de la dilución máxima de semilla en la que se detecta PrP^{res} después de la digestión con PK y su visualización mediante *Western blot*. Como controles se establecieron diluciones de 10⁻¹ o de 10⁻² sin ser sometidos a PMCA. Estos controles,

denominados no amplificados (NA), permiten distinguir la señal de PrP^{res} correspondiente a la semilla inicial respecto de la señal debida a la propagación propiamente dicha.

Por otro lado, se valoró la capacidad de mal plegamiento de las distintas proteínas recombinantes generadas a lo largo de este trabajo. Para ello se utilizaron diferentes proteínas mal plegadas (generadas previamente de forma espontánea o a través de semilla) que van desde una menor similitud aminoacídica hasta una mayor respecto a la secuencia de la PrP cuya capacidad de mal plegamiento se quiere evaluar. La metodología a seguir en este caso es la misma que la descrita anteriormente.

Para este estudio se utilizó una única ronda de PMCA de 48 h y la reproducibilidad del resultado se garantizó mediante el empleo de partículas de zirconia y sílice de 1 mm (BioSpec Products) (Fernández-Borges et al 2009).

7. Estudios bioquímicos de los priones

7.1. Estudio de resistencia de los priones a la digestión con PK

La resistencia a PK se evaluó en todos los casos incubando las muestras durante 60 min a 42 °C y a una agitación constante de 450 rpm (Thermomixer confort, Eppendorf).

Las concentraciones de PK (Roche) empleadas se adaptaron al tipo de muestra en estudio, de modo que en las muestras en las que la PrP del sustrato tenía un origen recombinante, la concentración de PK final fue de 25 µg/ml, mientras que si el origen era de encéfalo de mamífero, la digestión se llevó a cabo con 170 µg/ml de PK. Del mismo modo, con el objetivo de mejorar la reacción de digestión se utilizaron diferentes detergentes: 10% de sarkosyl (Sigma-Aldrich) en el caso de muestras de origen recombinante y 2% de Tween-20 (Sigma-Aldrich) + 2% de Nonidet P40 (Sigma-Aldrich) en el caso de origen mamífero. En todos los casos, la digestión se detuvo mediante la adición de *buffer* de carga *NuPAGE* (Invitrogen Life Technologies).

En casos excepcionales en los que las concentraciones de PK empleadas hayan sido distintas a las descritas, se indicará convenientemente.

7.2. Detección de proteínas mediante la técnica de Western blot

La inmunodetección de proteínas mediante la metodología de *Western blot* (WB) se llevó a cabo tras la separación proteica mediante electroforesis en gel SDS-PAGE. Aunque a veces la naturaleza de las muestras era diferente (muestras procedentes de PMCA recombinante o muestras procedentes de PMCA empleando PrP^c de origen mamífero) el sistema de electroforesis ha sido común para todas empleando así *Criterion TGX gel 4-15%* (Bio-Rad). Por otro lado, el sistema de transferencia utilizado se compone de membranas adsorbentes de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (*Trans-Blot Turbo Transfer Pack PVDF*, Bio-Rad) y electrotransferencia con el equipo *Trans Blot Turbo System* (Bio-Rad).

Tras bloquear las membranas con leche deslipidada al 5% (p/v) en PBS con Tween-20 al 0,05% (v/v) se procedió a la inmunodetección con diferentes anticuerpos primarios: Saf83 (1:400, Cayman Chemical) para su uso con la PrP murina con su extremo carboxilo terminal intacto; policlonal M20 (1:400, Santa Cruz Biotechnology) para la detección de las PrP murinas con deleciones desde los aminoácidos 141 al 176. En la mayoría de los casos se utilizó el anticuerpo secundario policlonal conjugado con peroxidasa de rábano *Goat anti-mouse IgG-HRP* (1:3.000, Santa Cruz Biotechnology). Excepcionalmente, el anticuerpo de *Donkey anti-goat IgG-HRP* (1:5.000, Santa Cruz Biotechnology) se utilizó como secundario para la unión del anticuerpo policlonal M20. Tras la reacción con cada anticuerpo se realizaron lavados con una solución de PBS y tween-20 al 0,2%. Finalmente, las bandas inmunoreactivas se revelaron por quimioluminiscencia empleando el kit *Super Signal West Pico* (Thermo Scientific Pierce) y la visualización de imágenes digitales se llevó a cabo mediante el equipo *FluorChem Q* (Alpha Innotech).

7.3. Cuantificación de bandas inmunoreactivas de PrP^{Pres}

El análisis densitométrico de las bandas inmunoreactivas obtenidas tras la metodología de WB se realizó mediante el empleo del software "AlphaView" (Alpha Innotech). Las imágenes de interés se analizaron por densitometría para evaluar la cantidad relativa de la señal de la banda inmunoreactiva y el resultado se cuantificó en términos de densidad óptica y se trasladó a porcentajes.

7.4. Estudio del patrón de migración electroforética por Coomassie

Para la detección por Coomassie de las muestras procedentes de sustrato basado en dextrano se procesaron 250 µl de la semilla recombinante, digirieron con 25 µg/ml de PK durante 1 h a 42 °C y centrifugaron a 19.000 g durante 1 h a 4 °C. Tras la precipitación, el material obtenido se resuspendió en 10 µl de PBS. Los productos obtenidos de la purificación se cargaron en un gel del 4-12% NuPAGE Midi (Invitrogen Life Technologies), se separaron y tiñeron con BlueSafe (NZYTech) durante 1 h a temperatura ambiente.

8. Estudios de infectividad *in vivo*

Con el fin de determinar de forma fehaciente si el material obtenido a lo largo de esta tesis doctoral cumple con las características de ser un prion *bona fide*, es decir, capaz de dar lugar a una enfermedad priónica *in vivo*, se llevaron a cabo diversas inoculaciones en el siguiente modelo de ratón:

- TgL108I: Ratones PrP transgénicos que expresan ± 4 veces la PrP^C murina con la mutación puntual L108I y sin expresar la PrP endógena.

En todos los casos, en el momento de la inoculación los animales tenían entre 4 y 6 semanas de edad. Los animales se anestesiaron con una mezcla de ketamina (100 mg/kg) / xilacina

(10 mg/kg) y posteriormente inocularon en el hipocampo utilizando una aguja hipodérmica de calibre 27 G con 20-30 μ l del inóculo de interés diluido 1:10 en PBS.

La evolución de la fase clínica se evaluó mediante la observación de signos clínicos en los animales dos veces por semana. Para considerar que un ratón tenía una sintomatología asociada a una enfermedad espongiiforme transmisible (EET), fue necesario detectar un mínimo de tres signos clínicos de disfunción neurológica de manera simultánea. Los signos clínicos observados fueron:

- Andar anadeante.
- Pelo erizado, áspero o alborotado.
- Cabeza embotada (poco alerta, no sigue estímulos externos con la cabeza).
- Mayor excitabilidad.
- Incontinencia urinaria.
- Espalda aplanada.
- Anormalidad evidente en la marcha.
- Descargas oculares pegajosas (legañas).
- Pérdida de peso.
- Animal con joroba y/o encorvado.

Cuando la progresión de la enfermedad era evidente se procedió a la eutanasia de los animales por razones éticas mediante dislocación cervical o inhalación de CO₂ para la toma de muestras biológicas. Tras la extracción del encéfalo completo, se realizó un corte longitudinal en el cerebro de manera que se separaron los dos hemisferios. El hemisferio cerebral derecho se congeló y almacenó a -80 °C para su posterior examen bioquímico mediante *Western blot*. El hemisferio cerebral izquierdo se fijó inmediatamente en formaldehído 10% (Sigma-Aldrich) para otros estudios.

9. Estudio neuropatológico

Los cerebros procedentes del ensayo de infectividad *in vivo* fijados en formaldehído al 10% se deshidrataron a través de concentraciones crecientes de alcohol, a través de xileno y finalmente se incluyeron en parafina. Las catorce secciones encefálicas analizadas fueron: corteza piriforme, hipocampo, corteza occipital, corteza temporal, corteza parietal, corteza frontal, estriado, tálamo, hipotálamo, mesencéfalo, médula oblonga, núcleos cerebelosos, vermis cerebeloso y corteza cerebelosa. Secciones de 4 μ m se montaron sobre portaobjetos de vidrio y se tiñeron con hematoxilina-eosina (HE) para su evaluación morfológica. Los cortes se montaron sobre portaobjetos de vidrio recubiertos con 3-trietoxisilil-propilamina para los estudios inmunohistoquímicos.

El estudio inmunohistoquímico (IHQ) para la observación de la PrP^{Sc} se realizó previo tratamiento de los cortes desparafinados en ácido fórmico y ebullición a pH bajo en una olla a presión. Las peroxidases endógenas se bloquearon y las muestras se trataron con PK y se incubaron

durante toda la noche con el anticuerpo primario 2G11 (Prionics AG, 1:1.000). El revelado se realizó utilizando el sistema DAKO EnVision [polímero conjugado a los anticuerpos secundarios con peroxidasa] junto con la 3,3'diaminobencidina (como sustrato cromógeno) para visualizar los depósitos de PrP^{Sc}.

La evaluación positiva de los animales a través de HE se determinó por cambios espongiiformes, presencia de vacuolización (intraneuronal) o espongiosis (en el neuropilo) de la sustancia gris. Se trató de discernir la espongiosis causada por EETs de la que se podía deber a la neurodegeneración neuronal asociada a la edad (sustancia blanca) o de la relacionada con la sobreexpresión de la proteína del prion (cuerpo calloso y capas profundas de la corteza, sin estar asociada a depósitos de PrP^{Sc}). En los ensayos IHQs se buscaron depósitos de proteína mal plegada, minimizando el marcaje de la PrP^C e identificando patrones de acumulación específicos de la PrP^{Sc}: patrón punteado, granular fino, intraneuronal, lineal (axones), placas (extracelular), estrellado (células gliales) y perivascular.

10. Cumplimiento de las normativas éticas

Este estudio se aprobó por el Comité de Ético para la Experimentación Animal de la Universidad de Santiago (número de permiso 15005/16/006) y se realizó de acuerdo con las recomendaciones para el cuidado y uso de animales de experimentación acorde a la legislación nacional española (R. 1201/05).

RESULTADOS

1. Generación de PrPs recombinantes murinas con deleciones para estudiar su efecto sobre el mal plegamiento

En estos últimos años, un número creciente de investigaciones se ha centrado en el estudio de la región N-terminal de la PrP y su papel en la patología priónica. Los primeros estudios que muestran su potencial rol se basan en la observación de mutaciones en esta región, en particular inserciones y deleciones en la parte de las octarepeticiones, que aparecen con frecuencia en pacientes diagnosticados de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) (G. G. Kovacs et al., 2005). Por otro lado, la región N-terminal, a pesar de no formar parte de la zona resistente a proteasas de la PrP^{res}, presenta actividad biológica dado que participa en la internalización mediada por clatrina y tráfico intracelular (Nunziante, Gilch, & Schätzl, 2003; S.-L. Shyng, Moulder, Lesko, & Harris, 1995; Sunyach et al., 2003). Por último, esta región ha adquirido un especial interés gracias a su reciente implicación como efector neurotóxico a través de una actividad regulada por el dominio C-terminal (Wu et al., 2017).

Con el fin estudiar cómo afectaba en el mal plegamiento de la proteína la delección de distintas zonas tanto de la región N-terminal como de la C-terminal en el mal plegamiento de la proteína, se generaron las siguientes construcciones (Figura 1).

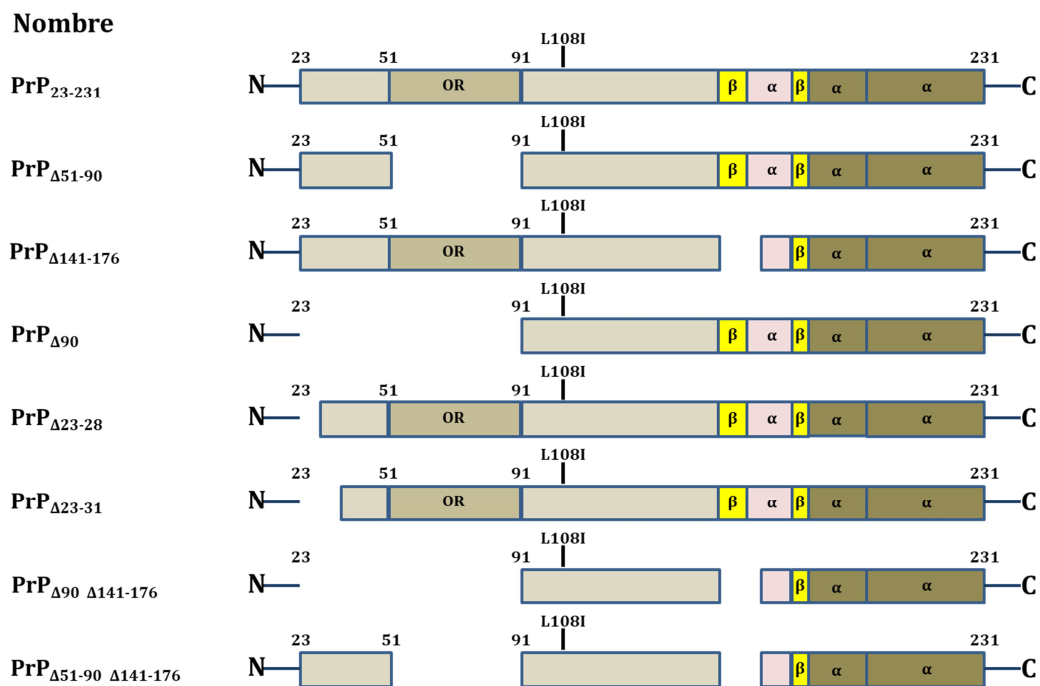


Figura 1. PrPs recombinantes murinas con deleciones. Proteínas recombinantes murinas que presentan diferentes deleciones tanto en la zona N-terminal como en la región C-terminal.

Todas las construcciones presentan la mutación puntual L108I. Esto se debe a que estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que la presencia de una isoleucina en esta posición favorece el mal plegamiento *in vitro* espontáneo (Fernández-Borges, Di Bari, et al., 2017). Por otro

lado, los ratones transgénicos que sobreexpresan la PrP murina L108I desarrollan una patología tipo priónica de forma espontánea (datos no publicados).

La selección de las zonas a delecionar se realizó basándose en diferentes estudios previos. La delección de las octarepeticiones se eligió fundamentándose en el estudio donde ratones transgénicos que expresaban PrPs delecionadas en esta región mantenían la propagación de *scrapie* a pesar de presentar mayores tiempos de incubación comparados con los mostrados por los ratones salvajes inoculados con la misma cepa (Flechsig et al., 2000). En cuanto a las delecciones $\Delta 90$ y $\Delta 141-176$, su selección se apoyó en los estudios que demostraron que una secuencia de tan solo 106 aminoácidos es capaz de adquirir una conformación de tipo priónica, resistente a Proteinasa K (PK) y capaz de autopropagarse en ratones transgénicos que expresan la misma proteína (Baskakov et al., 2000; Bonetto et al., 2002; Supattapone et al., 1999). Las delecciones $\Delta 23-28$ y $\Delta 23-31$ se seleccionaron basándose en estudios previos realizados tanto *in vitro* como *in vivo* en los que se muestra cómo la zona polibásica de la región N-terminal (aminoácidos del 23 al 27 en la secuencia de la PrP murina) está implicada en la toxicidad de las proteínas priónicas, (Khalifé et al., 2016). Por otro lado, los ratones transgénicos que expresan la proteína priónica con los aminoácidos 23-31 delecionados muestran una reducida susceptibilidad a la infección por priones y acumulan una menor cantidad de PrP^{res}. Por último, varios estudios sugieren que estos residuos se encuentran en un sitio crítico para la unión entre PrP^C y PrP^{res}, siendo necesaria su presencia para conseguir una propagación eficiente (Turnbaugh et al., 2012; Turnbaugh et al., 2011; Westergard et al., 2011b; Wu et al., 2017).

Tras la selección y generación de todas las construcciones para este trabajo, las recPrPs murinas resultantes se expresaron en *E.coli* y purificaron mediante columnas de afinidad a histidinas, tal y como se describe en Materiales y Métodos (apartado 4). Las proteínas eluidas se desnaturalizaron totalmente tras la adición de cloruro de guanidinio (hasta 6M) para su posterior conservación y llevadas a una concentración de trabajo entre 4 mg/ml y 6 mg/ml. Para poder determinar su pureza, se llevó a cabo una separación por electroforesis en geles SDS-PAGE seguida de una tinción por *Coomassie*.

Para la obtención de todos los sustratos a utilizar en los ensayos de propagación *in vitro* (Figura 2), las proteínas se dializaron frente a PBS con el fin de recuperar su conformación nativa y se complementaron con homogeneizados de encéfalos de ratones *Prnp^{0/0}* al 10% (p/v) en *buffer* de conversión. Los sustratos se alicuotaron y conservaron a -80 °C inmediatamente tras haber sido generados.

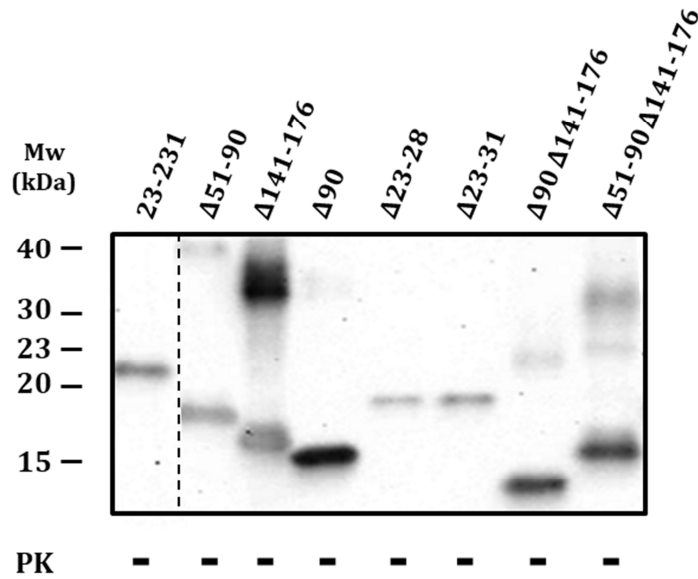


Figura 2. Sustratos recombinantes que contienen las proteínas murinas deletionadas. *Western blot* (WB) de todos los sustratos generados a partir de las proteínas recombinantes murinas mutadas en el que se puede observar sus distintos patrones de migración electroforética en función de sus tamaños. Las cantidades de PrP recombinante añadidas a cada sustrato se igualaron después de su medición por *BCA protein Assay* y dilución en PBS. La muestra en el carril 1 procede de un gel distinto, tal y como indica la línea de puntos. Esta muestra se alineó con el resto de las muestras utilizando los marcadores de peso molecular presentes en ambos gels. Revelado con el anticuerpo policlonal M20 (dilución 1:400). Mw: del inglés *molecular weight*, peso molecular. PK: Proteínasa K.

2. Estudio de la capacidad de mal plegamiento inducido por semilla

De todos los sustratos preparados a partir de las diferentes proteínas recombinantes se evaluó su capacidad de propagación y/o mal plegamiento que presentan *in vitro*.

Para determinar que proteínas eran capaces de propagar *in vitro*, se indujo su mal plegamiento utilizando como semilla un prion murino recombinante con la mutación puntual L108I generado espontáneamente *in vitro* previamente en el laboratorio. Con el uso de esta semilla se buscaba determinar qué proteínas eran capaces de propagar el mal plegamiento *in vitro*. La elección de esta semilla como iniciadora del proceso se debió, por una parte, a que se trataba del prion con mayor similitud en secuencia aminoacídica a las proteínas generadas en el laboratorio (se ha observado que diferencias en tan solo un aminoácido entre la secuencia del sustrato y la semilla puede ser suficiente para bloquear la propagación) y, por otra parte, a que utilizando directamente una semilla recombinante se elimina la barrera de transmisión derivada de las diferencias existentes entre PrP recombinantes (sustrato) y las provenientes de encéfalo (semilla).

La capacidad de mal plegamiento de las proteínas se evaluó mediante una única ronda de recPMCA de 48 horas, empleando diluciones seriadas de la semilla. La cantidad de proteína mal plegada utilizada como semilla se igualó para reducir la variabilidad en la capacidad de

propagación. De igual manera, la concentración de las proteínas recombinantes que componían los diferentes sustratos se ajustaron utilizando *BCA Protein Assay* y se comprobaron posteriormente mediante *Western blot*. Las diluciones de semilla empleadas en cada sustrato fueron de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} . El estudio se realizó por duplicado. Para cuantificar el grado de propagación, las señales obtenidas se compararon con aquellas que se observaban a partir de las mismas muestras diluidas 10^{-1} y 10^{-2} que no se sometieron a recPMCA (NA: no amplificadas).

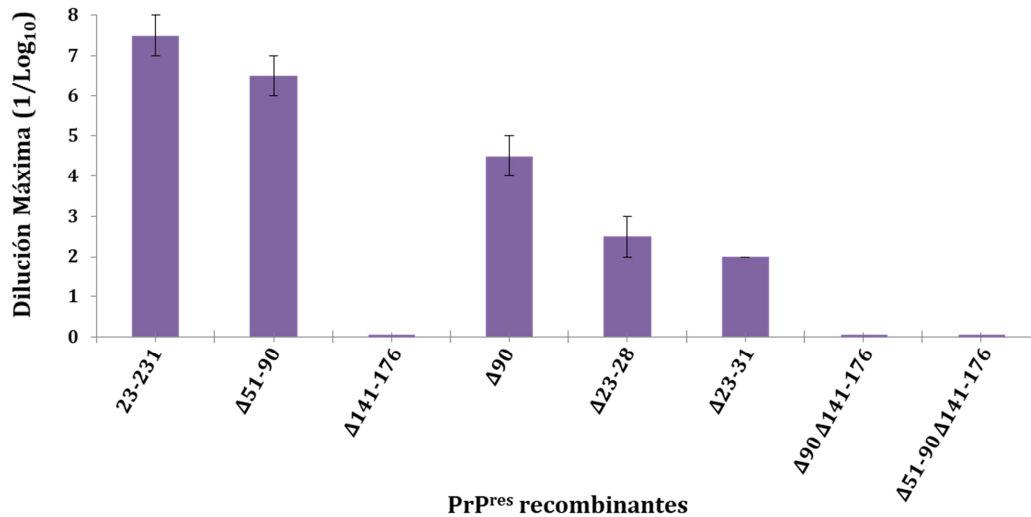


Figura 3. Estudio de la capacidad de mal plegamiento de las proteínas recombinantes murinas con diferentes deleciones. Representación gráfica de la media (incluyendo el error estándar de la media de 2 repeticiones) de las diluciones máximas a las que pudo propagar la proteína mal plegada utilizada como semilla. Los sustratos utilizados contenían las PrPs recombinantes portadoras de las diferentes deleciones y se detectaron después de su digestión con PK mediante *Western blot*.

Todas las proteínas con deleciones en la región N-terminal presentaron una alta capacidad de mal plegamiento al ser inducidas a través de semilla. Sin embargo, las proteínas recombinantes que contenían deleciones en la región C-terminal de la proteína no propagaron la semilla. Las proteínas que muestran una mayor capacidad propagativa son aquellas que poseen una deleción mayor en número de aminoácidos, en contraposición a las que contienen deleción únicamente la región polibásica.

3. Estudio de la capacidad de mal plegamiento espontáneo

Con el fin de evaluar la capacidad intrínseca de las diferentes proteínas a mal plegarse y valorar así la influencia de las deleciones en este proceso, se realizó un estudio de mal plegamiento espontáneo. El interés de este estudio responde a que la gran mayoría de los casos de enfermedad priónica en humanos son esporádicos, es decir, presumiblemente como consecuencia de un mal plegamiento espontáneo de la proteína del prion. Además, por estudios previos realizados en el laboratorio, se sabe que la ausencia de semilla lleva a la generación de una diversidad de mal plegamientos, lo que permitiría el análisis de distintas variantes conformacionales con características distintivas.

Con el objetivo de favorecer la aparición de mal plegamientos espontáneos, los sustratos se sometieron a un máximo de 13 rondas seriadas de recPMCA de 24 horas, empleando 4 tubos (duplicados intraexperimentales). Tras cada ronda, un 10% de la muestra sonicada se mezcló con un 90% de sustrato nuevo y se sometió a una nueva ronda de amplificación. Estos estudios se repitieron en las mismas condiciones (duplicados interexperimentales) manteniendo en todos los casos el mismo sonicador, temperatura y potencia de sonicación para reducir en lo posible la variabilidad en un sistema muy sensible a dichos parámetros. El riesgo de contaminación de las muestras a través del agua del sonicador se controló aislando los tubos con película autosellante (Parafilm).

La detección de los mal plegamientos espontáneos se llevó a cabo a través de inmunodetección por WB, tras la observación de fragmentos resistentes a la digestión con PK (recPr^{Pres} o rPr^{Pres}). La proteína recombinante murina L108I se utilizó como control positivo de mal plegamiento espontáneo.

Únicamente las proteínas recPrP_{Δ51-90} y recPrP_{Δ90} se mal plegaron espontáneamente entre las rondas 3 y 6 de recPMCA. Por el contrario, ninguna de las proteínas que presentan deleciones en la región C-terminal o aquellas que presentan pequeñas deleciones entre los aminoácidos 23-31 de la región N-terminal (recPrP_{Δ23-28} y recPrP_{Δ23-31}) se mal plegaron (Figura 4). El hecho de que las proteínas deleccionadas en la región N-terminal sí que se mal plegaran a partir de una semilla (*vide supra*) sugiere que ciertas regiones de la zona N-terminal son las responsables de modular o dirigir la capacidad de mal plegamiento espontáneo, mientras que la región C-terminal sería necesaria para presentar una capacidad de mal plegamiento completa.

Se observan diferencias notables en el momento de aparición de recPr^{Pres} entre el primer experimento y los dos siguientes, estas diferencias podrían deberse a que, en el primer experimento, el sonicador de trabajo no se encontrara en óptimas condiciones; sin embargo, la variabilidad observada en el número de ronda donde aparece el mal plegamiento espontáneo entre las otras repeticiones experimentales así como en los duplicados intraexperimentales —donde los parámetros de sonicación se controlaron más estrechamente— indicarían que las diferencias observadas se deben probablemente a la estocasticidad en la creación de núcleos de agregación, previos a la formación de las recPr^{Pres}.

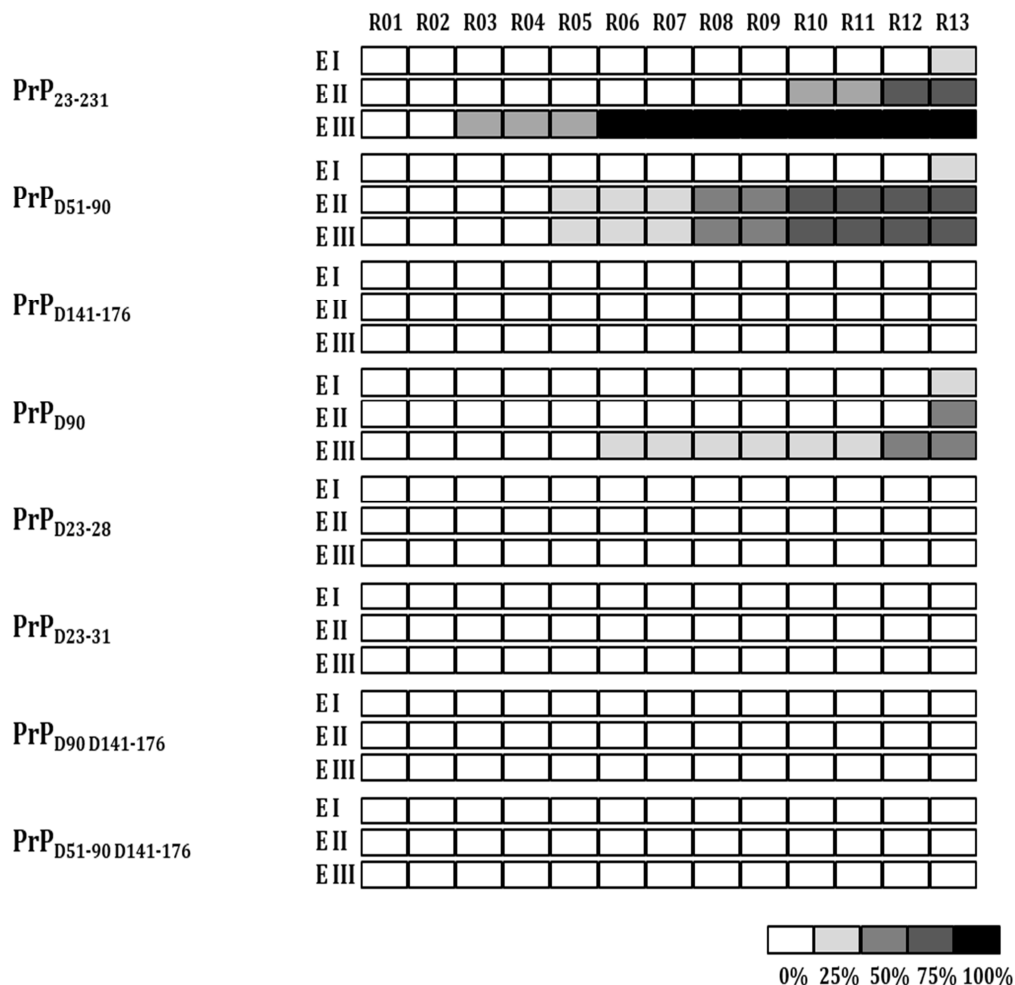


Figura 4. Estudio de la capacidad de mal plegamiento espontáneo de las proteínas recombinantes murinas con diferentes deleciones. Representación gráfica de la aparición de mal plegamiento proteico espontáneo evaluado tras el análisis mediante WB de las rondas de recPMCA (R01-R13) a las que se sometieron los sustratos. Todas las proteínas se testaron un mínimo de tres veces (denominadas experimentos, EI-EIII). El porcentaje de tubos positivos tras cada ronda de recPMCA se ha señalado con distintas intensidades de grises, tal y como se indica en la leyenda situada en la parte inferior de la figura.

4. Estudio de la capacidad de mal plegamiento de las proteínas con deleciones C-terminal inducida por semillas con una mayor similitud de secuencia

Dada la incapacidad de las proteínas portadoras de la deleción $\Delta 141-176$ para mal plegarse tanto inducidas por la semilla recPrP^{res} L108I como de forma espontánea, se realizó un experimento que buscaba una mayor similitud de secuencia entre la semilla y las proteínas susceptibles de mal plegarse. Para ello, se utilizaron aquellas semillas recombinantes mal plegadas previamente (*vide supra*) y que contenían las correspondientes deleciones $\Delta 51-90$ y $\Delta 90$ (recPrP^{res} _{$\Delta 51-90$} y recPrP^{res} _{$\Delta 90$}).

La semilla recPrP^{res} _{$\Delta 51-90$} tampoco indujo el mal plegamiento en ninguna de las proteínas con deleciones en el extremo C-terminal (Figura 5). Sin embargo, tanto las proteínas recPrP _{$\Delta 23-28$}

RESULTADOS

como recPrP Δ_{23-31} se mal plegaron con diluciones de 10^{-5} y 10^{-6} de la misma semilla, respectivamente, 2 a 3 órdenes de magnitud mayores que cuando se utilizó la semilla recPrP^{res}L108I.

La semilla recPrP^{res} Δ_{90} tampoco indujo el mal plegamiento de ninguna de las proteínas con la delección $\Delta_{141-176}$ (Figura 6) pero mal plegó aquellas proteínas delecionadas en la zona polibásica del extremo amino terminal del orden de 10 a 100 veces más eficientemente a lo observado con la semilla recPrP^{res} L108I.

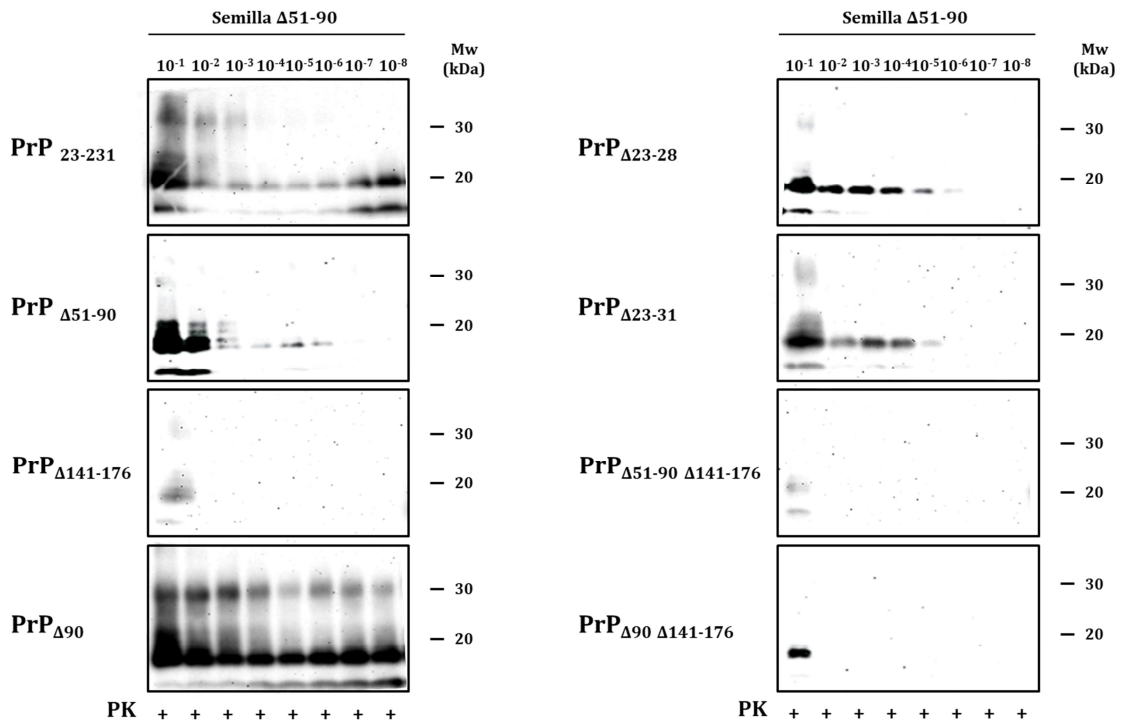


Figura 5. Estudio de la capacidad de mal plegamiento de las proteínas recombinantes murinas con diferentes delecciones inducido por la semilla recPrP^{res} Δ_{51-90} . Mal plegamiento inducido por la semilla recPrP Δ_{51-90} observado mediante *Western blot*. La semilla se diluyó desde 10^{-1} hasta 10^{-8} y las diluciones sometidas a una ronda de recPMCA utilizando sustratos que contenían las diferentes proteínas recombinantes. Todas las proteínas mostraron mal plegamiento inducido por la semilla exceptuando las portadoras de la delección $\Delta_{141-176}$. En todos los casos se incluye un control de recPrP Δ_{23-231} sin digerir con PK. Revelados con el anticuerpo policlonal M20 (dilución 1:400). Mw: del inglés *molecular weight*, peso molecular.

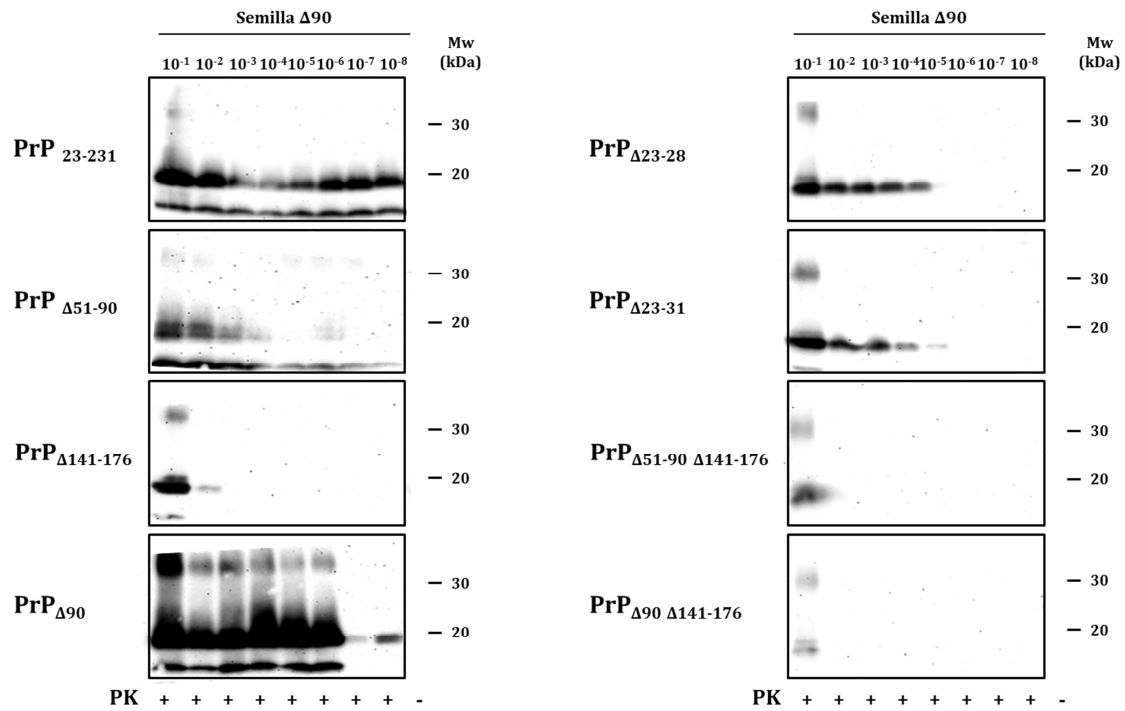


Figura 6. Estudio de la capacidad de mal plegamiento de las proteínas recombinantes murinas con diferentes deleciones inducido por la semilla recPrP^{res}_{Δ90}. Mal plegamiento inducido por la semilla recPrP_{Δ90} observado mediante *Western blot*. La semilla se diluyó desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁸ y las diluciones sometidas a una ronda de recPMCA utilizando sustratos que contenían las diferentes proteínas recombinantes. Todas las proteínas mostraron mal plegamiento inducido por la semilla exceptuando las portadoras de la deleción Δ141-176. En todos los casos se incluye un control de recPrP₂₃₋₂₃₁ sin digerir con PK. Revelados con el anticuerpo policlonal M20 (dilución 1:400). Mw: del inglés *molecular weight*, peso molecular.

En el estudio de la proteína recPrP_{Δ141-176} que se observa en la figura 6, se visualiza una posible amplificación de hasta una dilución de 10⁻². Sin embargo, aunque el tamaño no es el esperado, para asegurarse de que estas señales vinieran de la dilución de la semilla y no de una amplificación real, se realizaron pases seriados, en los que el 10% del material obtenido del pase anterior se mezcló con un 90% de sustrato nuevo y se sometió a una nueva ronda de amplificación durante 24 horas. Tras realizar 3 rondas más (resultados no mostrados), se concluyó que la recPrP^{res} observada no era realmente una propagación a expensas de la nueva proteína delecionada, sino que la recPrP^{res} detectada se correspondía con la señal remanente del inóculo utilizado.

Por último, las proteínas delecionadas en la región C-terminal se trataron de mal plegar utilizando como semilla el miniprion 106 (Supattapone et al., 1999), realizando un total de 30 rondas seriadas sin observarse mal plegamiento alguno. Por todo ello, los estudios se continuaron sin utilizar las proteínas con deleciones en el extremo C-terminal dada su incapacidad de mal plegarse por ninguno de los procedimientos utilizados.

5. Caracterización bioquímica de las recPrP^{res} generadas espontáneamente

De cada una de las 3 proteínas portadoras de diferentes deleciones que se mal plegaron espontáneamente, se seleccionaron 3 muestras procedentes de duplicados intra e inter-experimentales para su caracterización bioquímica (Figura 7).

Con el objetivo de disponer de una mayor variabilidad tanto bioquímica como biológica, se eligieron muestras que mostraran una aparente diversidad conformacional reflejada a través de una diversidad en los patrones de migración electroforética. De esta forma, se seleccionaron tres muestras que llamaremos variantes por cada una de las distintas proteínas con capacidad de mal plegamiento: PrP₂₃₋₂₃₁, PrP_{Δ51-90} y PrP_{Δ90} (Figura 7).

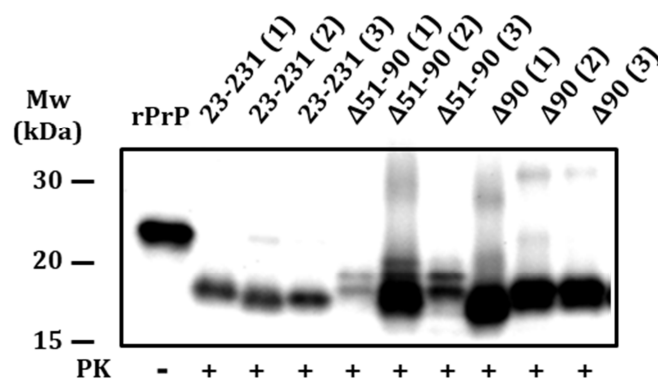


Figura 7. *Western blot* de las PrP recombinantes mal plegadas seleccionadas. Las cepas se escogieron por presentar patrones electroforéticos diferentes, en este caso la primera variante de cada semilla posee patrón diferente a sus semejantes en secuencia. Las muestras se trataron con 25 µg/ml de PK y la membrana se reveló utilizando el anticuerpo monoclonal Saf83 (1:400). El control es recPrP₂₃₋₂₃₁ sin digerir con PK. Mw: del inglés *molecular weight*, peso molecular.

Los patrones de migración electroforética, asociados a estas proteínas después de ser digeridas con PK, muestran diferencias fácilmente observables en la figura 7. Concretamente, las muestras recPrP^{res}₂₃₋₂₃₁ (1), recPrP^{res}_{Δ51-90} (2) y recPrP^{res}_{Δ90} (1) son aquellas que presentan un patrón distintivo. Esta diferencia bioquímica nos permitirá clasificarlas a la vez que estudiarlas en mayor profundidad para conocer si sus propiedades vienen condicionadas únicamente por sus deleciones particulares o, por el contrario, también son dependientes de las potenciales variaciones conformacionales que presenten.

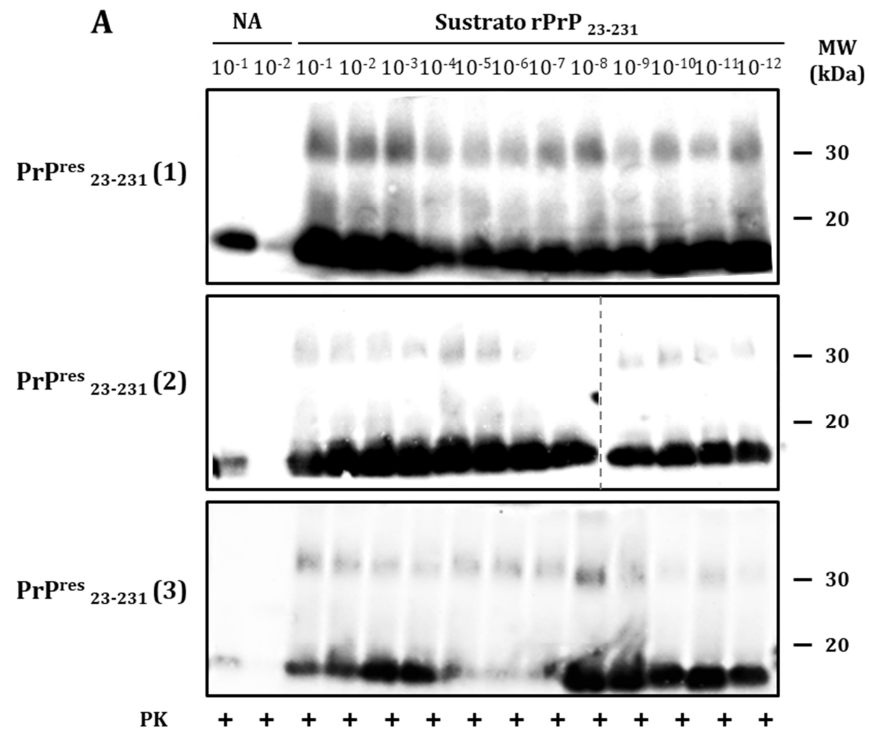
5.1. Evaluación de la capacidad de propagación

La capacidad de auto-perpetuación de los priones es una de sus características principales, por ello, se analizó la capacidad de cada una de estas proteínas recombinantes para mantener el mal plegamiento de diferentes semillas utilizando sustratos preparados a partir de la correspondiente proteína. La capacidad relativa de mal plegamiento se evaluó a través de la dilución máxima de semilla a la que se podía detectar recPrP^{res} tras una única ronda de PMCA. Para

RESULTADOS

ello, se realizaron diluciones con cada una de las recPr^{Pres} generadas en sustratos que contenían la misma proteína delecionada. La cantidad de recPr^{Pres} en las semillas se ajustó tratando de mantener cantidades similares. Las diluciones llevadas a cabo fueron de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} y 10^{-12} . Las semillas diluidas 10^{-1} y 10^{-2} sin someterse a recPMCA se utilizaron como controles para realizar el cálculo de propagación efectiva.

Ninguna de las proteínas recombinantes utilizadas como semillas presentaron diferencia alguna entre ellas, mostrando todas una capacidad de propagación de entre 10^{-11} a 10^{-12} (Figura 8).



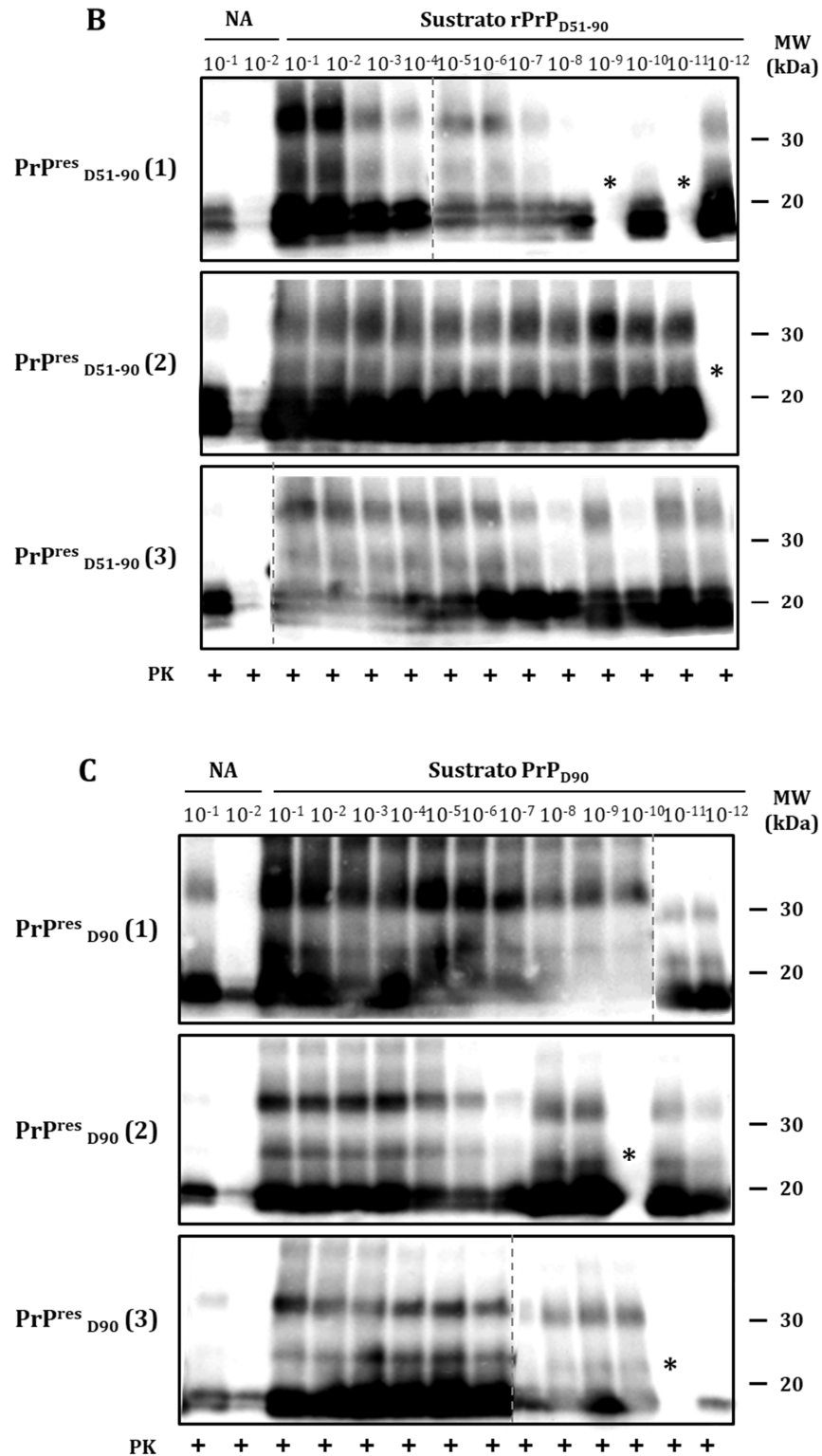
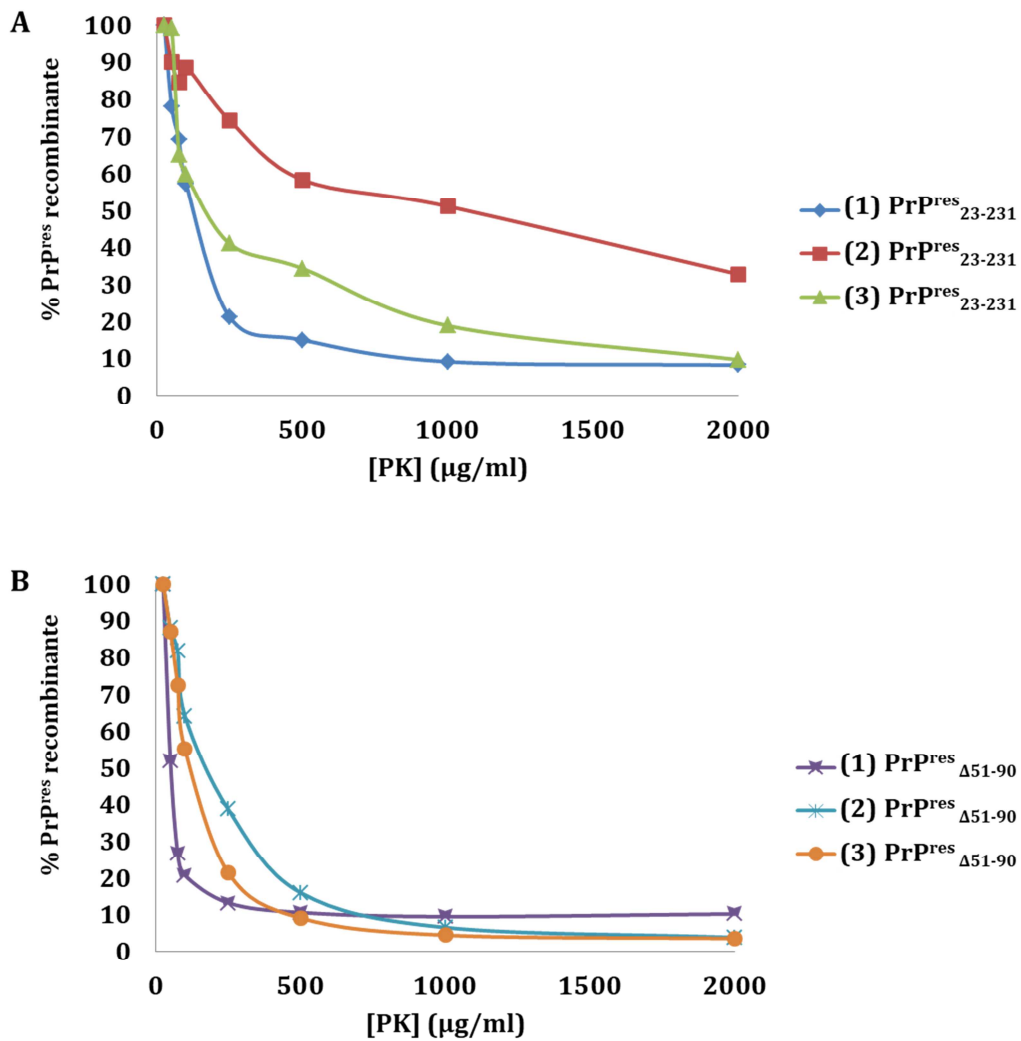


Figura 8. Estudio de la capacidad de propagación de las proteínas recombinantes mal plegadas con deleciones. *Western blot* de las proteínas recombinantes mal plegadas. Evaluación de las 3 semillas **A)** PrP₂₃₋₂₃₁, **B)** PrP_{Δ51-90} y **C)** PrP_{Δ90}. Ninguna de las cepas utilizadas muestra diferencia alguna en su capacidad propagativa en su propio sustrato, no pudiéndose seleccionar diferentes variantes a través de su capacidad autopropagativa. Las muestras se trataron con 25 μg/ml de PK y se revelaron utilizando el anticuerpo monoclonal Saf83 (1:400). Las líneas punteadas hacen referencia a que las muestras

proviene de geles diferentes, pero están ajustadas utilizando el marcador de peso molecular. NA: no amplificado. Mw: del inglés *molecular weight*, peso molecular.

5.2. Estudio de la resistencia a proteasas

La resistencia parcial a ciertas proteasas es otra de las características que adquieren muchas de las proteínas mal plegadas de tipo priónico. Para estudiar la existencia de potenciales variantes conformacionales entre las proteínas mal plegadas generadas, se llevó a cabo un ensayo de resistencia a PK utilizando concentraciones crecientes. El grado de resistencia se evaluó mediante *Western blot* y su análisis densitométrico posterior (figura 9).



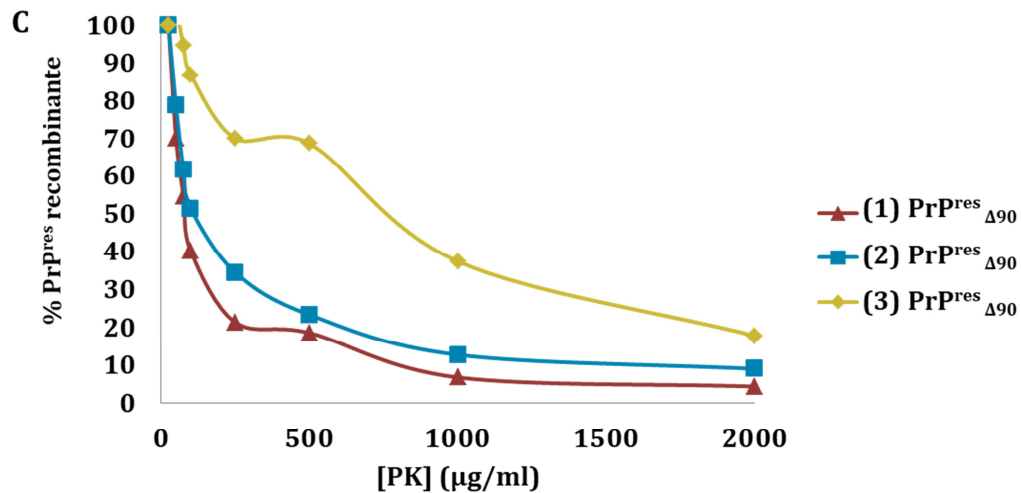


Figura 9. Estudio de la resistencia a PK de las proteínas recombinantes mal plegadas murinas con deleciones y generadas espontáneamente. Representación gráfica del análisis densitométrico de las bandas inmunoreactivas obtenidas por *Western blot*, **A)** semillas PrP₂₃₋₂₃₁, **B)** PrP_{Δ51-90} y **C)** PrP_{Δ90}. Las muestras se digirieron con concentraciones crecientes de PK en 3 experimentos independientes (25, 50, 75, 100, 250, 500, 1000 y 2000 µg/ml). La densidad de la señal obtenida tras digerir con 25 µg/ml se consideró 100% y los cálculos posteriores se hicieron en relación a esta. Ninguna de las semillas presentó una diferencia notoria que permitiera discernirlas de entre sus semejantes. Los *Western blot* se revelaron con el anticuerpo monoclonal Saf83 (1:400).

Todas las recPrP^{res} analizadas muestran una resistencia similar a la digestión con PK, lo que junto con su capacidad de propagación también similar, sugiere que las diferencias conformacionales entre ellas se base en el corte diferencial que presentan algunas tras su corte con PK y que se refleja en una mayor migración electroforética (ver Figura 9).

5.3. Ensayo de infectividad *in vitro*

Ha sido ampliamente demostrado que la PMCA basada en PrP de encéfalo permite propagar un gran número de cepas de priones que proceden de una amplia variedad de especies de mamífero y que, con algunas excepciones, estos priones propagados *in vitro* mantienen sus características de cepa y son infecciosos *in vivo*. Sin embargo, las proteínas recombinantes mal plegadas propagadas *in vitro* presentan una capacidad infecciosa variable (Timmes, Moore, Fischer, & Priola, 2013; Fei Wang et al., 2010). De tal forma que algunas son altamente infecciosas y otras no lo son en absoluto. Recurrir a un bioensayo en ratones para conocer las características de cada una de las proteínas mal plegadas generadas requeriría de un esfuerzo económico y en tiempo inasumible. De ahí que, con el fin de comprobar si alguna de las recPrP^{res} seleccionadas pudiera ser infecciosa *in vivo*, se llevó a cabo un ensayo de infectividad *in vitro* utilizando la PMCA con encéfalos provenientes de ratones transgénicos que sobreexpresan 3-4 veces la PrP murina con la mutación puntual L108I como sustrato. Se utilizó este modelo animal por su mayor similitud de secuencia

aminoacídica con la de las recPrPs a estudiar. Como semilla en este estudio se seleccionó un total de nueve proteínas recombinantes: tres recPrP^{res}₂₃₋₂₃₁, tres recPrP^{res}_{Δ51-90} y tres recPrP^{res}_{Δ90}.

Se realizó un total de 5 rondas seriadas de PMCA en las que el 10% de la muestra obtenida del pase anterior se mezcló con un 90% de sustrato nuevo y se sometió a una nueva ronda de amplificación durante 24 horas. El resultado de infectividad *in vitro* mostró que únicamente una de las tres proteínas recombinantes mal plegadas cuya delección consistía en la eliminación de las octarepeticiones [recPrP^{res}_{Δ51-90} (2)] mal plegó la PrP^C del sustrato (Figura 10).

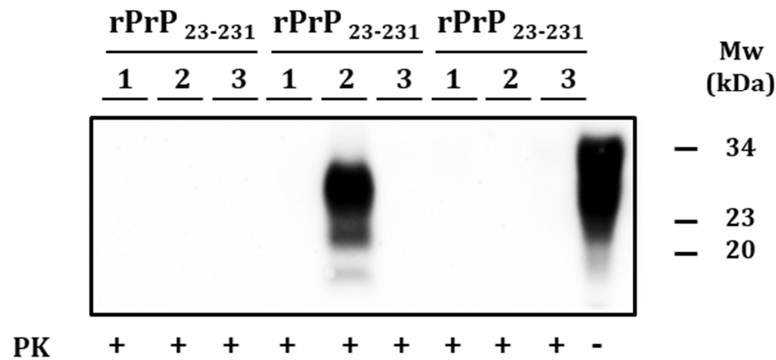


Figura 10. Estudio de infectividad *in vitro* de las PrP^{res} murinas generadas espontáneamente utilizando PMCA. Las muestras obtenidas de la ronda 3 de PMCA después de digerirlas con 170 µg/ml de PK se visualizaron y analizaron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE y *Western blot*. Solo la cepa recPrP^{res}_{Δ51-90}(2) es capaz de inducir mal plegamiento de la PrP^C de encéfalo, clara evidencia de su posible potencial infeccioso en ensayos *in vivo*. El sustrato utilizado en la PMCA consistió en un homogeneizado de encéfalo de ratón TgL108I. La membrana se reveló con el anticuerpo monoclonal Saf83 (1:400). Mw: del inglés *molecular weight*, peso molecular.

El estudio de infectividad *in vitro* predice que únicamente la proteína mal plegada recPrP^{res}_{Δ51-90} (2) podría ser infecciosa en un bioensayo utilizando ratones (ver estudio más adelante). El hecho de que una única recPrP^{res} de entre todas las proteínas seleccionadas fuese capaz de mal plegar la PrP de encéfalo, sugiere que a pesar de sus características bioquímicas similares, las recPrP^{res} presentan importantes diferencias en sus propiedades biológicas y, presumiblemente, también en sus características estructurales. Dado que ninguna de las proteínas mal plegadas que contenía la PrP completa y tampoco ninguna que contenía la PrP delecionada de los primeros 90 aminoácidos fue infecciosa *in vitro*, sugiere que la infectividad pudiera no estar determinada por las características de las proteínas recombinantes *per se* sino que una particular variante conformacional infecciosa surgió en una proporción de uno a nueve, independientemente del tipo de PrP recombinante utilizada. Estudios posteriores tratarán de verificar esta hipótesis buscando si hay alguna correlación entre el tipo de proteína recombinante utilizada y la obtención de una estructura infecciosa.

6. Influencia de la región N-terminal en la determinación de las propiedades bioquímicas y biológicas de las recPrP^{res} obtenidas de forma espontánea

Con el fin de estudiar la influencia de la región N-terminal a la hora de determinar las características bioquímicas y biológicas de las proteínas mal plegadas, se seleccionaron las 6 cepas que poseían su extremo N-terminal truncado (3 recPrP^{res}_{Δ51-90} y 3 recPrP^{res}_{Δ90}) y se utilizaron como semilla en dos tipos de sustratos: 1) compuesto de proteína recPrP₂₃₋₂₃₁L108I (proteína completa con la mutación puntual L108I) y 2) compuesto de la proteína recombinante que no es homóloga; es decir, la proteína recPrP^{res}_{Δ51-90} sirvió de semilla para un sustrato el cual contenía la proteína recPrP_{Δ90} y por la otra parte, la proteína recPrP^{res}_{Δ90} sirvió de semilla para un sustrato compuesto de proteína recombinante PrP_{Δ51-90} (Figura 11).

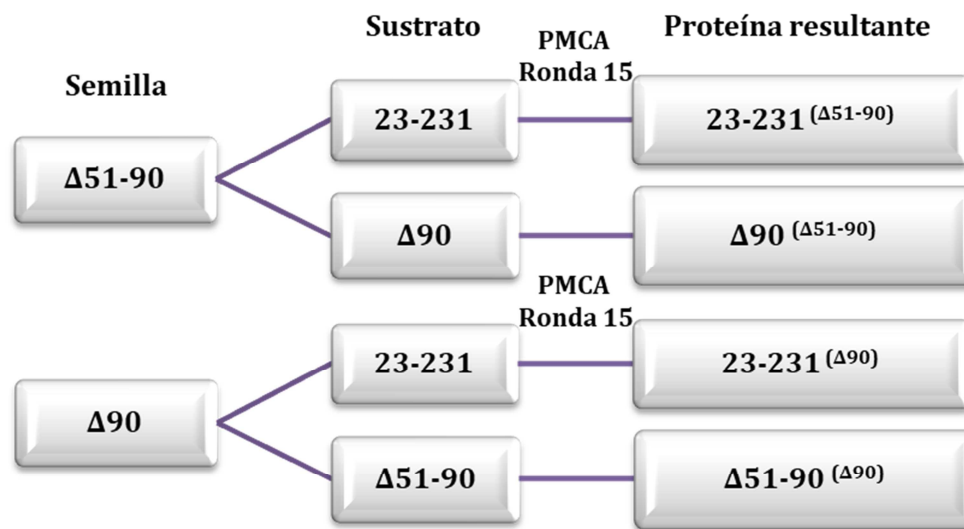


Figura 11. Esquema de la estrategia utilizada para el estudio de la influencia de la región N-terminal en la determinación de las características bioquímicas y biológicas.

La semilla inicial utilizada para llevar a cabo la conversión del nuevo sustrato se eliminó por dilución después de realizar un mínimo de 15 rondas (dilución 1:10) seriadas de recPMCA. Así, la nueva recPrP^{res} obtenida tras la última ronda de recPMCA correspondía al menos a una dilución 10⁻¹⁵ de la semilla inicial que, según el número de Avogadro, aseguraba la completa eliminación de todas las moléculas de la semilla original (Saa et al., 2006b).

Se generaron 12 nuevas semillas que junto con las 9 generadas espontáneamente conforman un total de 21 semillas cuyos patrones de migración electroforética tras su digestión con PK se observan en la figura 12. El patrón electroforético de las 6 semillas generadas espontáneamente y propagadas cada una de ellas en dos sustratos diferentes (PrP₂₃₋₂₃₁ y PrP_{Δ51-90} o PrP_{Δ90}) se conserva a pesar de contener una región N-terminal diferente. Por tanto, las muestras que provienen de semillas cuyo núcleo resistente es más pequeño siguen presentando una región resistente a PK que da lugar a una banda de menor peso molecular que la que poseen sus homólogas. Lo mismo ocurre cuando las muestras se generan a partir de semillas cuyo tamaño del núcleo resistente a PK es de mayor peso molecular, dado que estas también mantienen este mismo patrón de banda. Estos resultados sugieren que independientemente de la región N-terminal que

posean las proteínas, las potenciales variantes estructurales que dan lugar a diferencias bioquímicas se mantienen.

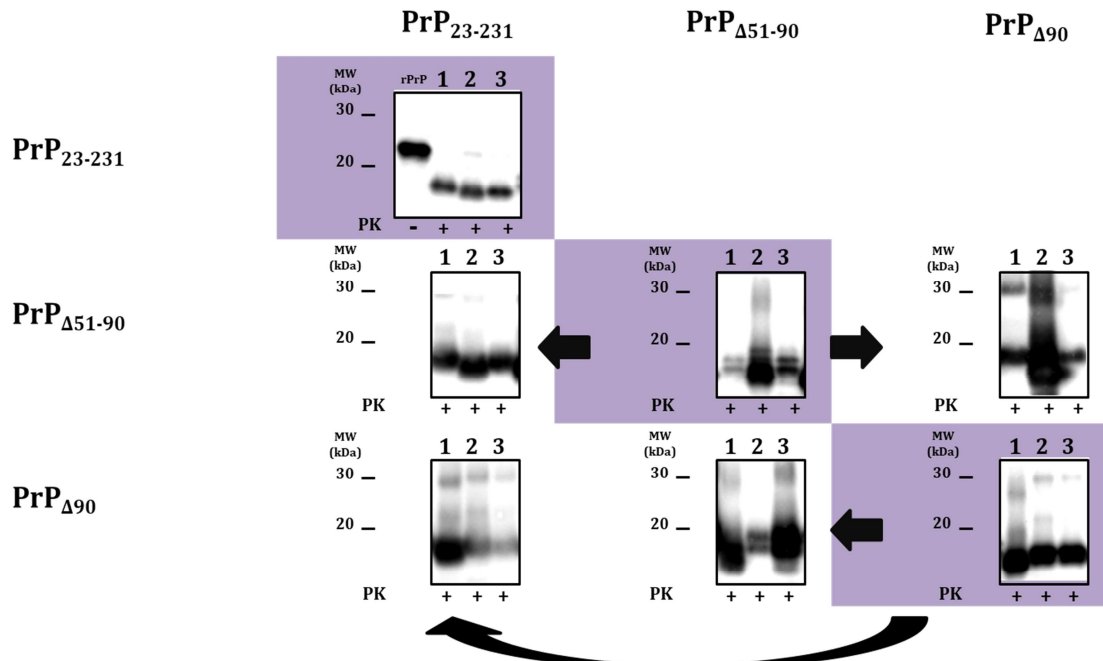


Figura 12. Análisis bioquímico de las 9 semillas generadas espontáneamente y las 12 nuevas muestras generadas a partir de las anteriores. Estudio bioquímico por *Western blot* que muestra las 9 (3x3) semillas originales generadas espontáneamente y las 12 nuevas muestras generadas a partir de estas utilizando los sustratos correspondientes compuestos de las proteínas recPrP₂₃₋₂₃₁, recPrP_{Δ51-90} y recPrP_{Δ90}. Los patrones electroforéticos de las 6 semillas originales propagadas en los dos sustratos, cuya región N-terminal es diferente, se conserva. Las muestras generadas a partir de las semillas originales pertenecen a la ronda 15 de recPMCA. Todas las muestras se trataron con 25 µg/ml de PK y se analizaron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE y *Western blot*. Las membranas se revelaron con el anticuerpo monoclonal Saf83 (1:400). Mw: del inglés *molecular weight*, peso molecular.

Dado que las características bioquímicas básicas parecían haberse mantenido independientemente del tipo de región N-terminal que tuvieran las proteínas, se estudió si la infectividad *in vitro* también se había mantenido.

De forma similar a lo descrito anteriormente, se realizó un estudio de infectividad *in vitro* utilizando como semillas las seis proteínas mal plegadas más características que se sometieron a 3 rondas seriadas de PMCA de encéfalo. Los resultados muestran como la infectividad se mantuvo únicamente en aquellas muestras que tenían una región N-terminal completa o deletada exclusivamente en la zona de octarepeticiones. Por el contrario, las muestras que contenían una deleción de los primeros 90 aminoácidos no presentaron infectividad *in vitro*, a pesar de que bioquímicamente mostraron un comportamiento similar a sus homólogas infecciosas. Estos resultados sugieren que la zona inicial N-terminal, aquellos 30 aminoácidos que diferencian a las

muestras infecciosas y no infecciosas, podrían ser los responsables de mantener la infectividad (Figura 13).

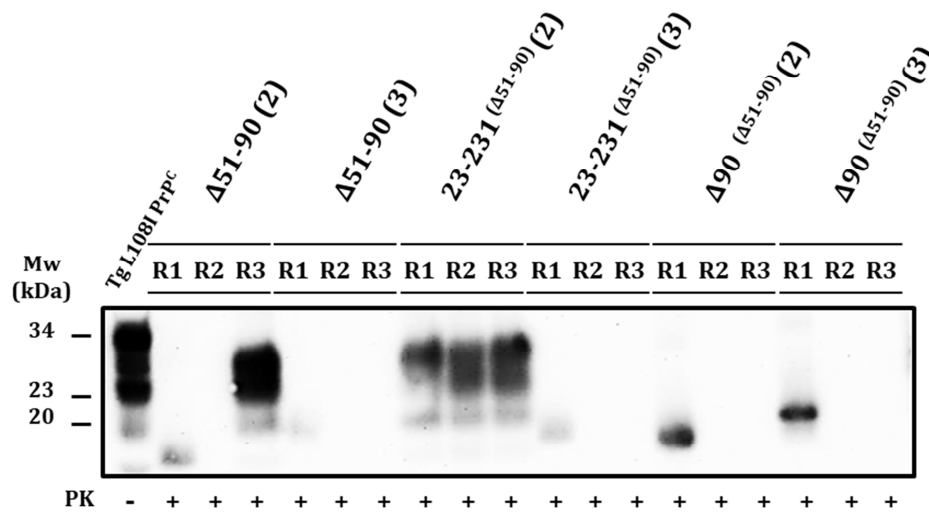


Figura 13. Estudio de infectividad *in vitro* de las proteínas recombinantes mal plegadas murinas con deleciones generadas a partir de semillas delecionadas en la región N-terminal. Las muestras obtenidas de las rondas 1, 2 y 3 de PMCA (R1, R2 y R3 respectivamente) de las semillas originales Δ51-90 (2) y Δ51-90 (3) y de estas propagadas en dos sustratos diferentes (PrP₂₃₋₂₃₁ y PrP₂₃₋₂₃₁ o PrP₂₃₋₂₃₁) después de digerirlas con 170 μg/ml de PK se visualizaron y analizaron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE y *Western blot*. Las semillas Δ51-90 (2) y 23-231^(Δ51-90) (2) son las únicas que muestran infectividad *in vitro*, a pesar de que todas las semillas que provienen de la Δ51-90 (2) mantienen su patrón electroforético característico. El sustrato utilizado en la PMCA consistió en un homogeneizado de encéfalo de ratón TgL108I. La membrana se reveló con el anticuerpo monoclonal Saf83 (1:400). Mw: del inglés *molecular weight*, peso molecular.

6.1. Influencia de la región polibásica en la propagación *in vitro* y en la infectividad

Los resultados previos han mostrado que mientras una proteína delecionada en sus primeros 90 aminoácidos es capaz de propagarse *in vitro*, la proteína mal plegada resultante pierde la capacidad de infectar *in vitro* (Figura 13). Dado que la única diferencia entre la proteína mal plegada progenitora (infecciosa) y la nueva proteína es que esta carece de una región polibásica situada entre los aminoácidos 23-31 de la región N-terminal, se realizó un estudio encaminado a dilucidar el rol de esta región tanto en propagación como en infectividad. Esta región se encuentra altamente conservada en la mayoría de las especies atribuyéndoles en numerosos estudios un papel relevante en el mal plegamiento e interacción de la PrP^C con la PrP^{Sc} (Khalifé et al., 2016; Turnbaugh et al., 2012; Turnbaugh et al., 2011; Westergard et al., 2011b; Wu et al., 2017).

Por ello, el estudio se centró en estudiar la capacidad de propagación de 2 proteínas mal plegadas delecionadas únicamente en la región de octapéptidos, una que había demostrado ser infecciosa *in vitro* [recPrP^{res}_{Δ51-90} (2)] y otra que con idéntica secuencia aminoacídica no lo era [recPrP^{res}_{Δ51-90} (3)]. La propagación de ambas proteínas se realizó en dos tipos de sustratos que

contenían proteínas con diferentes deleciones en la región polibásica. Concretamente, se utilizaron las proteínas recPrP $_{\Delta 23-28}$ y recPrP $_{\Delta 23-31}$ (figura 14) y se realizaron 15 pases seriados de recPMCA.

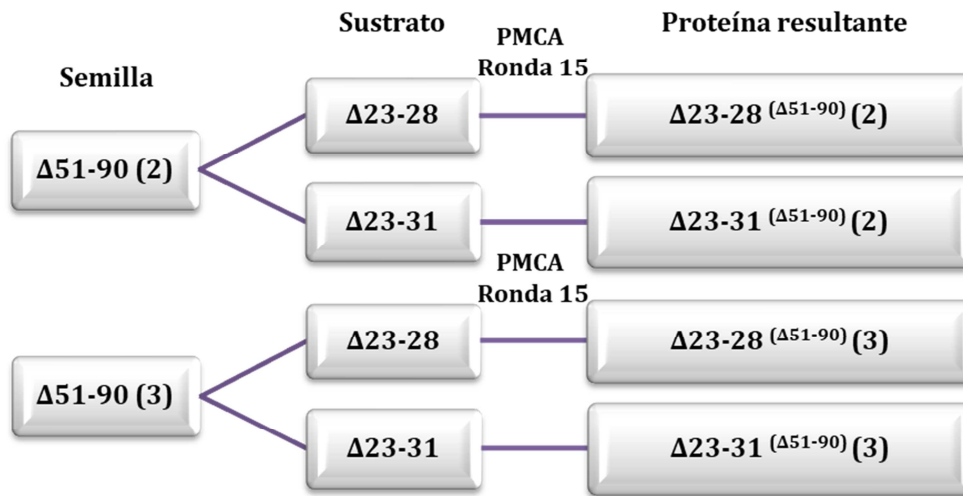


Figura 14. Esquema de la estrategia seguida para estudiar la influencia de la región polibásica en propagación e infectividad.

Los resultados muestran como ambas proteínas delecionadas en la zona polibásica propagaron eficientemente las dos proteínas mal plegadas [recPrP $^{\text{res}}_{\Delta 51-90}$ (2) y recPrP $^{\text{res}}_{\Delta 51-90}$ (3)], mostrando un patrón de migración electroforético similar al de las semillas predecesoras (Figura 15 A). Este resultado, aunque esperado dado que la proteína con 90 aminoácidos delecionados también se había propagado eficientemente, sugiere que la zona polibásica definitivamente no inhibe la propagación *in vitro*. Sin embargo, la proteína mal plegada PrP $^{\text{res}}_{D90}$, aun mostrando una buena propagación *in vitro*, no mantuvo las propiedades infecciosas. Debido a ello, se estudió la capacidad de infectar *in vitro* de las 6 semillas generadas al propagar las proteínas sin octarepeticiones en las que no poseen la región polibásica (Figura 15 B). El estudio consistió en 5 pases seriados de PMCA con encéfalos de TgL108I y mostró cómo ninguna de las proteínas mal plegadas mal plegó la PrP $^{\text{C}}$ proveniente del encéfalo.

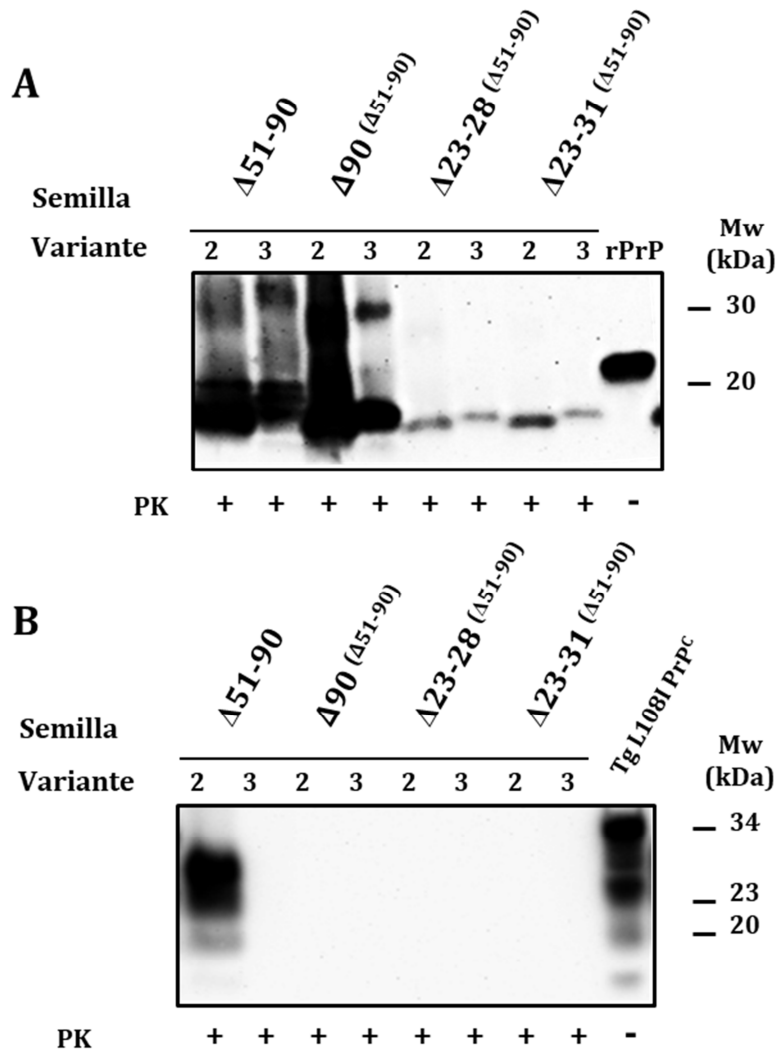


Figura 15. Patrones de migración electroforéticos y estudio de infectividad *in vitro* de las dos recPrP^{res} originales generadas espontáneamente comparados con las seis recPrP^{res} derivadas de estas sin la región polibásica. A) Se utilizaron las dos semillas espontáneas que carecen de la región de las octarepeticiones [recPrP^{res} $\Delta 51-90$ (2) y recPrP^{res} $\Delta 51-90$ (3)] (línea 1 y 2) y estas dos semillas originales sin octarepeticiones propagadas sobre sustratos que contienen las proteínas recPrP $\Delta 90$, recPrP $\Delta 23-28$ y recPrP $\Delta 23-31$ (líneas 3 y 4; 5 y 6; 7 y 8 respectivamente). Todas las muestras mostradas corresponden al pase 15 de recPMCA. Los patrones de migración se mantienen, mostrando el mismo patrón que muestra la semilla de la que provienen. **B)** Se analizaron las muestras obtenidas de la ronda 3 de la PMCA de encéfalo de las variantes 2 y 3 de las proteínas $\Delta 51-90$, $\Delta 90(\Delta 51-90)$, $\Delta 23-28(\Delta 51-90)$ y $\Delta 23-31(\Delta 51-90)$. Las semillas que poseen deletada la región polibásica no muestran infectividad *in vitro*, ni aun habiendo mantenido su patrón electroforético. El sustrato utilizado en la PMCA consistió en un homogeneizado de encéfalo de ratón TgL108I. Las muestras recombinantes se trataron con 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PK y las procedentes de PMCA de encéfalo con 170 $\mu\text{g}/\text{ml}$, se analizaron y visualizaron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE y *Western blot*. Las membranas se revelaron con el anticuerpo monoclonal Saf83 (1:400). Mw: del inglés *molecular weight*, peso molecular.

Los resultados obtenidos sugieren que la región polibásica podría tener un papel determinante a la hora de mantener ciertas propiedades como la infectividad *in vitro* y, por lo tanto, podría estar relacionada con la interacción y el mal plegamiento con la PrP^C.

Hasta el momento, de todas las semillas generadas espontáneamente tan solo la variante 2 de la proteína $\Delta 51-90$ muestra capacidad infectiva *in vitro*; no obstante, a pesar de que todas las proteínas que presentan deleciónada su región N-terminal en sus diferentes versiones son capaces de permitirle a esta semilla su propagación y perpetuación e inclusive de mantener el patrón de migración electroforético, la propiedad infectiva desaparece cuando la región polibásica se elimina.

6.2. Estudio del mantenimiento de las propiedades de la recPrP^{Pres} con deleciones tras su propagación en la proteína completa

La propagación de la semilla recPrP^{Pres} $\Delta 51-90$ (2) propagada a expensas de la proteína recombinante murina en su versión completa dio lugar a una recPrP^{Pres} que mantuvo su infectividad *in vitro* e incluso parecía observarse un incremento de dicha infectividad (Figura 13). Para estudiar si las deleciones en la región polibásica perdían esta capacidad, por ser esta región indispensable para inducir el mal plegamiento de la PrP^C o, por el contrario, por no poder propagar fielmente el mal plegamiento de la semilla (y por tanto dar lugar a una variante conformacional con propiedades distintas), se propagaron todas las recPrP^{Pres} mostradas en el apartado anterior sobre la PrP recombinante completa con el fin de determinar si se recuperaba la infectividad *in vitro*. Para ello, se realizaron PMCA's seriadas de hasta 15 pases utilizando como sustrato la proteína recPrP²³⁻²³¹L108I. El objetivo fue recuperar la capacidad infectiva que posee la semilla 2 devolviéndolo a un entorno de proteína completa y, por tanto, confirmar si la presencia o ausencia de ciertos aminoácidos en la región N-terminal tienen un papel importante en el mantenimiento de determinadas propiedades como la de propagarse a expensas de la PrP^C de encéfalo.

La nueva generación de semillas provistas de nuevo de la región N-terminal se muestra en la figura 16. El patrón de migración al propagarse sobre la proteína completa se pierde en todas las muestras a excepción de la semilla recPrP^{Pres} $\Delta 90$ (recPrP^{Pres} $\Delta 51-90$) que muestra un patrón de movilidad electroforética similar a la de la semilla original.

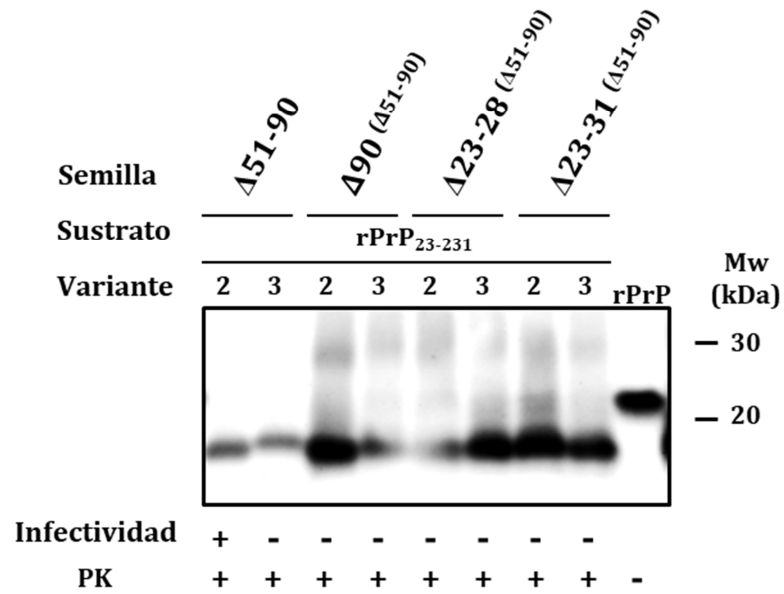


Figura 16. Patrones de migración electroforéticos de las 8 recPrP^{Pres} propagadas en recPrP₂₃₋₂₃₁ originadas a partir de proteínas mal plegadas carentes de región N-terminal. Se utilizaron las dos semillas espontáneas que carecen de la región de las octarepeticiones [recPrP^{Pres} $\Delta 51-90$ (2) y recPrP^{Pres} $\Delta 51-90$ (3)] (línea 1 y 2) y las semillas carentes de región polibásica generadas por la propagación de las semillas originales sin octarepeticiones a expensas de sustratos que contienen las proteínas recombinantes recPrP $\Delta 90$, recPrP $\Delta 23-28$ y recPrP $\Delta 23-31$ (Figura 15A) (líneas 3 y 4; 5 y 6; 7 y 8 respectivamente), adaptadas todas a la proteína completa. El patrón electroforético característico se pierde en las semillas, exceptuando la semilla recPrP^{Pres} $\Delta 90$ (recPrP^{Pres} $\Delta 51-90$) que lo mantiene. Las muestras generadas a partir de las semillas originales pertenecen a la ronda 15 de recPMCA. Todas las muestras se trataron con 25 μ g/ml de PK y se analizaron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE y *Western blot*. Las membranas se revelaron con el anticuerpo monoclonal Saf83 (1:400). Mw: del inglés *molecular weight*, peso molecular.

Con el objeto de comprobar si la propagación utilizando la proteína completa y, por tanto, incluyendo de nuevo la región polibásica devolvía la capacidad infectiva *in vitro* a las semillas, se realizaron 5 pases seriados en PMCA de encéfalo con cada una de las semillas. Sorprendentemente, si bien el cambio del patrón electroforético parecía indicar también un cambio conformacional, ninguna de las semillas mostró capacidad infectiva *in vitro* (Figura 17) con la excepción de la semilla original (2) en el sustrato PrP₂₃₋₂₃₁L108I dando lugar a recPrP^{Pres}₂₃₋₂₃₁(recPrP^{Pres} $\Delta 51-90$) (2).

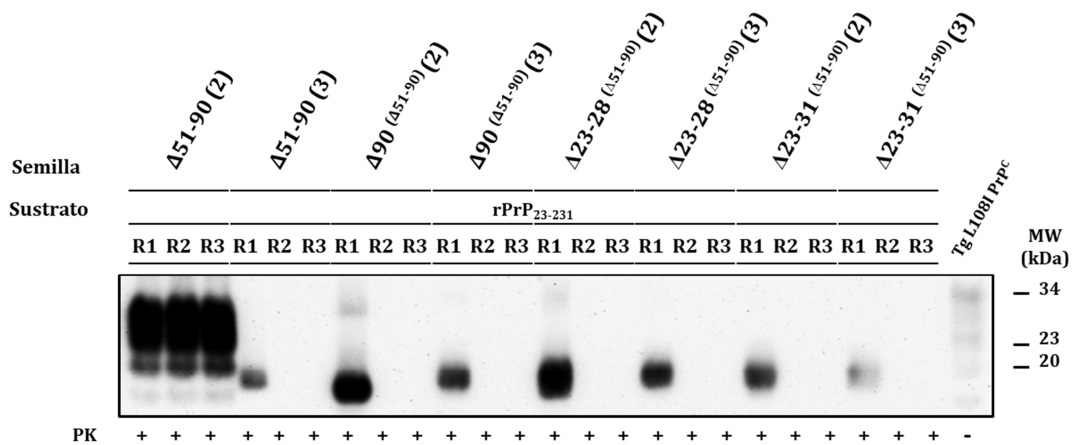


Figura 17. Estudio de infectividad *in vitro* de las 8 recPrP^{res} propagadas en recPrP₂₃₋₂₃₁ originadas a partir de proteínas carentes de región N-terminal. Las muestras generadas en las rondas 1, 2 y 3 de PMCA (R1, R2 y R3 respectivamente) de cada una de las semillas utilizadas se estudiaron bioquímicamente mediante *Western blot*. La semilla Δ51-90 (2), propagada utilizando la proteína completa, es la única que presenta infectividad *in vitro*; ninguna de las semillas carentes de la región N-terminal propagadas utilizando la PrP completa mal plegaron la PrP de encéfalo. El sustrato utilizado en la PMCA consistió en un homogeneizado de encéfalo de ratón Tg L1081. Todas las muestras se trataron con 170 μg/ml de PK y se analizaron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE. Las membranas se revelaron con el anticuerpo monoclonal Saf83 (1:400). Mw: del inglés *molecular weight*, peso molecular.

Los resultados sugieren que la región polibásica, más que estar directamente implicada en la infectividad *in vitro*, tendría un papel selector a la hora de permitir la propagación de ciertas variantes conformacionales presentes en la semilla original. Por tanto, en ausencia de esta región se favorecería la propagación de aquellas variantes estructurales sin capacidad infectiva *in vitro*, lo que sugiere que las semillas originales estarían formadas por un conjunto de conformaciones con características diferentes y que solo aquellas capaces de adaptarse al nuevo sustrato poseen la habilidad de propagarse y perpetuarse.

7. Estudio del efecto de diferentes sustratos en la propagación de proteínas mal plegadas y el mantenimiento de sus propiedades bioquímicas y biológicas

Asumiendo que en el proceso de generación espontánea de proteínas mal plegadas se obtienen mezclas con propiedades bioquímicas y biológicas distintivas (Fernández-Borges, Di Bari, et al., 2017) y debido a la observación de que el extremo N-terminal en un entorno de encéfalo de ratón podría actuar como un tamizador permitiendo propagar únicamente determinadas conformaciones, se estudiaron diferentes entornos (sustratos) con el fin de evaluar su potencial capacidad para seleccionar variantes conformacionales infecciosas.

7.1. Estudio del efecto de un sustrato complementado con homogeneizado de encéfalo de pollo sobre la propagación selectiva de determinadas proteínas mal plegadas

Estudios de nuestro laboratorio han demostrado previamente que la utilización de sustratos complementados con homogeneizados de encéfalo de pollo mejora significativamente la eficiencia de propagación de proteínas recombinantes mal plegadas, cuando se compara con sustratos complementados con homogeneizados de encéfalo de ratón *Prnp^{0/0}*. Habiendo descartado cualquier efecto debido a la presencia de PrP^C de pollo, que no interfiere en el mal plegamiento de otras recPrPs y no es mal plegable, parece que la mejora sobre la capacidad de propagación pudiera deberse a la existencia de cofactores que se encontrarían en cantidades diferentes o incluso ser específicos. Por tanto, las variantes conformacionales generadas o propagadas en sustratos complementados con homogeneizados de encéfalo de pollo podrían poseer características diferentes, probablemente debido a una selección específica en este entorno.

Para este estudio se utilizaron las semillas recPrP^{res}_{Δ51-90} (2) y recPrP^{res}_{Δ51-90} (3) y se realizaron 15 rondas seriadas de PMCA en sustrato que contenía la misma recPrP complementado con el homogeneizado de encéfalo de pollo. Los resultados muestran cómo ambas variantes conformacionales mantienen sus propiedades bioquímicas aparentes en el entorno basado en encéfalo de pollo (Figura 18).

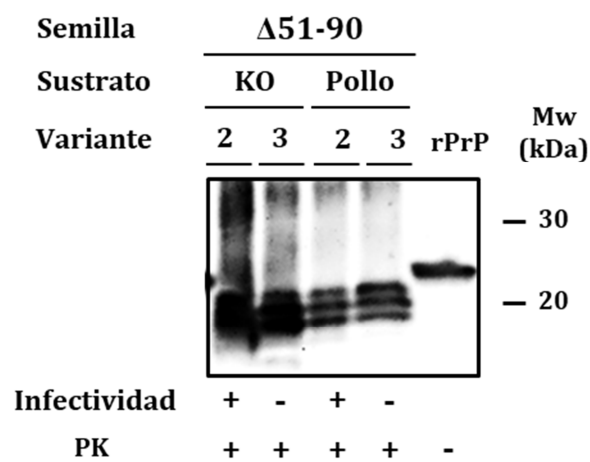


Figura 18. Estudio bioquímico de cuatro variantes conformacionales carentes de la región de las octarepeticiones propagadas utilizando sustratos complementados con homogeneizados de encéfalo de ratón *Prnp^{0/0}* y de encéfalo de pollo. Estudio comparativo por *Western blot* donde se muestran dos proteínas mal plegadas propagadas en dos entornos diferentes: recPrP + encéfalo de ratón *Prnp^{0/0}* o recPrP + encéfalo de pollo. Los patrones electroforéticos característicos de las semillas originales se mantienen al mal plegar la proteína recombinante de igual secuencia en un entorno de encéfalo de pollo. Las bandas resistentes que se muestran pertenecen a las semillas en fase 15. Todas las muestras se trataron con 25 µg/ml de PK y se analizaron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE. Las membranas se revelaron con el anticuerpo monoclonal Saf83 (1:400). Mw: del inglés *molecular weight*, peso molecular. PK: Proteinasa K. KO: del inglés *knock out*.

Dado que las diferencias en el patrón de migración se habían mantenido, se evaluó si cada una de ellas conservaba las propiedades biológicas originales. Para ello, se realizaron 5 pases seriados utilizando PMCA de encéfalo proveniente de ratones TgL108I. Los resultados muestran que la capacidad infectiva *in vitro* se mantiene en el caso de la semilla derivada de la recPrP^{res}_{Δ51-90} (2), así como la ausencia de infectividad *in vitro* de la semilla recPrP^{res}_{Δ51-90} (3) (Figura 19). Estos resultados sugieren que los factores presentes en el encéfalo de pollo no ejercen una presión selectiva diferente a la que ejerce el entorno original y, por tanto, no favorece la propagación de variantes específicas.

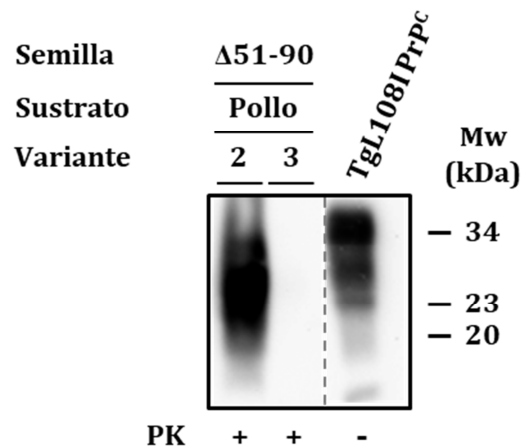


Figura 19. Estudio de infectividad *in vitro* de las recPrP^{res} propagadas en un entorno de encéfalo de pollo. La infectividad de las muestras generadas en la ronda 3 de PMCA de las semillas recPrP^{res}_{Δ51-90} (2) y recPrP^{res}_{Δ51-90} (3) propagadas en dos entornos diferentes: recPrP + encéfalo de ratón *Prnp*^{0/0} o recPrP + encéfalo de pollo, se evaluó mediante *Western blot*. Solo la variante 2 es capaz de inducir mal plegamiento de la PrP^C de encéfalo, a pesar de encontrarse en un entorno diferente, con lo que el homogeneizado de pollo no ejerce presión selectiva sobre las variantes conformacionales existentes. El sustrato utilizado en la PMCA consistió en un homogeneizado de encéfalo de ratón TgL108I. Todas las muestras se trataron con 170 μg/ml de PK y se analizaron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE. Las membranas se revelaron con el anticuerpo monoclonal Saf83 (1:400). Las líneas punteadas hacen referencia a que las muestras provienen de geles diferentes, pero están ajustadas utilizando el marcador de peso molecular. Mw: del inglés *molecular weight*, peso molecular.

7.2. Estudio del efecto del dextrano sulfatado en la propagación selectiva de determinadas proteínas mal plegadas

Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que el dextrano sulfatado añadido al sustrato tiene la propiedad de actuar como un cofactor que permite la propagación de únicamente ciertas variantes conformacionales (Fernández-Borges, Di Bari, et al., 2017). Dado que uno de los objetivos era estudiar el potencial efecto de determinadas regiones de la PrP sobre la propagación de ciertas proteínas mal plegadas, se utilizaron 9 de ellas que habían sido generadas espontáneamente y que, como consecuencia de presentar tres regiones N-terminal diferentes,

habían mostrado propiedades bioquímicas y biológicas diferenciales (3 recPrP^{res}₂₃₋₂₃₁, 3 recPrP^{res}_{Δ51-90} y 3 recPrP^{res}_{Δ90}).

7.2.1. Estudio de la propagación de las semillas recPrP₂₃₋₂₃₁L108I, recPrP_{D51-90}L108I y recPrP_{D90}L108I

A partir de las nueve semillas descritas en el apartado 5, se realizaron pases seriados durante 15 rondas en un sustrato complementado con dextrano sulfatado. El objetivo era seleccionar proteínas mal plegadas con una conformación capaz de propagarse en presencia de un cofactor específico.

En todos los casos, las potenciales mezclas de proteínas mal plegadas iniciales utilizadas como semillas se propagaron eficientemente en el nuevo sustrato desde la primera ronda. En este experimento se prepararon también muestras sin semilla de cada tipo de proteína como controles de mal plegamiento espontáneo. Todas las proteínas se mal plegaron espontáneamente, al igual que ocurre en un entorno de encéfalo de ratón *Prnp*^{0/0}. En el caso de la recPrP₂₃₋₂₃₁ el mal plegamiento espontáneo se observó en la ronda 10, en la recPrP_{Δ51-90} a partir de la ronda 6 y en la recPrP_{Δ90} en la ronda 3. Cabe recordar que en el caso de estas proteínas propagadas en un entorno de encéfalo de ratón *Prnp*^{0/0}, la proteína recPrP₂₃₋₂₃₁ mostró un mal plegamiento espontáneo a partir de la ronda 3, la proteína recPrP_{Δ51-90} el mal plegamiento espontáneo se observó a partir de la ronda 5 y en el caso de la proteína recPrP_{Δ90}, ocurrió en la ronda 6.

A pesar de que únicamente 3 de las 9 proteínas utilizadas como semillas presentaran un patrón de migración electroforético distinto a sus semejantes, todas las nuevas proteínas mal plegadas propagadas en un sustrato complementado con dextrano sulfatado mostraron un mismo patrón (figura 20). El cambio de patrón bioquímico es especialmente marcado en el caso de las semillas recPrP_{Δ51-90}L108I donde se presenta en forma de multibanda difiriendo significativamente del patrón mostrado por las semillas originales. En términos generales, todas las semillas al adaptarse al sustrato con dextrano sulfatado se uniformizaron en su patrón de migración. Este hecho sugiere que el dextrano sulfatado podría favorecer la propagación predominante de una única variante conformacional, que podría haber estado presente como especie minoritaria en las semillas originales obtenidas en un entorno de encéfalo *Prnp*^{0/0}.

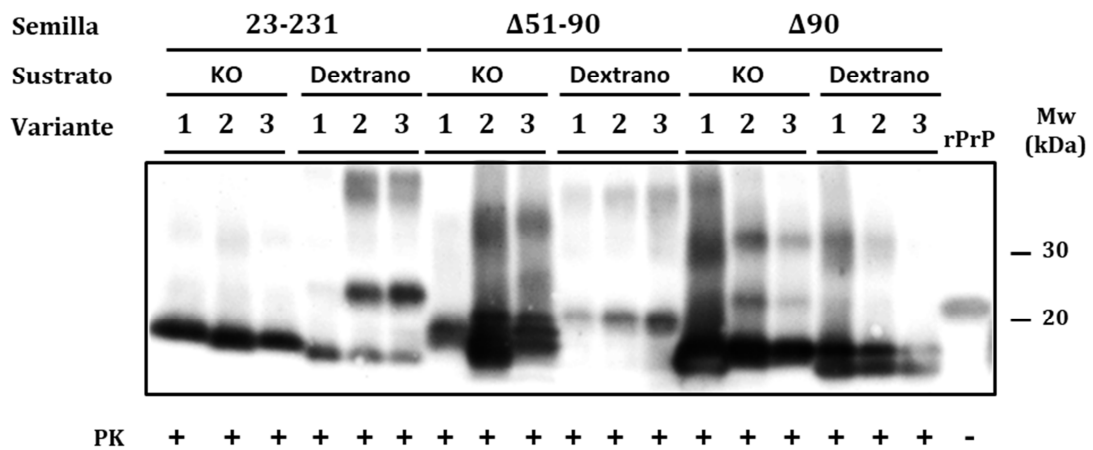


Figura 20. Estudio bioquímico de las proteínas mal plegadas propagadas en un sustrato que contiene dextrano sulfatado. Estudio comparativo donde se muestra el patrón electroforético de las semillas obtenidas espontáneamente utilizando un sustrato complementado con homogeneizado de encéfalo *Prnp^{0/0}* (izquierda) y las mismas variantes en un sustrato complementado con dextrano sulfatado (derecha) divididas en grupos de 3. Los patrones electroforéticos se uniformizan entre todas las variantes que comparten la misma secuencia aminoacídica cuando son propagadas en el sustrato complementado con dextrano sulfatado, mientras que las semillas de las que proceden presentan diferencias electroforéticas significativas. Las bandas resistentes que se muestran pertenecen a las semillas en fase 15. Todas las muestras se trataron con 25 µg/ml de PK y se analizaron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE mediante *Western blot*. Las membranas se revelaron con el anticuerpo monoclonal Saf83 (1:400). Mw: del inglés *molecular weight*, peso molecular. PK: Proteínasa K. KO: del inglés *knock out*.

RESULTADOS

Con el fin de confirmar que el dextrano sulfatado tiene la propiedad de propagar/seleccionar siempre la misma conformación mal plegada y aprovechando que el entorno libre de homogeneizado de encéfalo permite visualizar el patrón de bandas mediante la tinción por Coomassie, se compararon las nuevas proteínas mal plegadas después de digerirlas con PK (Figura 21). Todas las muestras presentaron una banda principal de 16-17 kilodalton y un patrón de fragmentos similar que sugieren que el dextrano sulfatado favorece la propagación preferencial de una variante determinada.

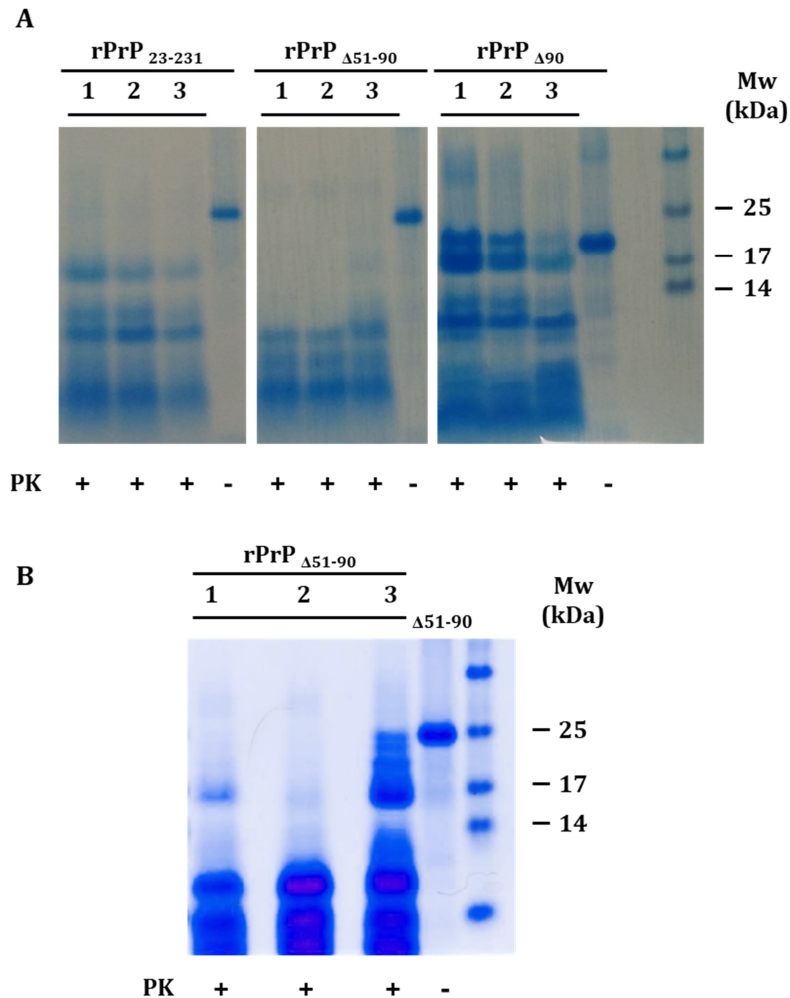


Figura 21. Estudio del patrón electroforético de las recPrP^{Pres} (23-231, Δ51-90 y Δ90) propagadas en sustrato complementado con dextrano sulfatado por Coomassie. A) Patrón de electroforético de las proteínas mal plegadas 23-231, Δ51-90 y Δ90 donde se observan todos los fragmentos teñidos por Coomassie. Todas las muestras digeridas con 25 μg/ml de PK presentan una banda de ~17kDa y un patrón de bandas muy similar. **B)** Proteínas Δ51-90 mal plegadas después de su propagación en un sustrato complementado con dextrano sulfatado. Las muestras digeridas con 25 μg/ml muestran la presencia de una banda de 17 kDa, y el patrón multibandeado observado en el *Western blot*. Las muestras se cargaron y separaron en geles SDS-PAGE para una posterior tinción por Coomassie. Mw: del inglés *molecular weight*, peso molecular. PK: Proteinasa K.

Con el fin de estudiar qué tipo de proteína mal plegada había permitido propagar el sustrato complementado con dextrano sulfatado, se evaluó la infectividad *in vitro* mediante PMCA de encéfalo de TgL108I (Figura 22). Los resultados muestran como en todos los tipos de PrP se había propagado alguna proteína mal plegada infecciosa. Tal y como se esperaba, la variante conformacional $\Delta 51-90$ (2) se mantuvo infecciosa y dentro del grupo de 23-231 y $\Delta 90$, parecían haberse seleccionado también proteínas infecciosas *in vitro*. Llama especialmente la atención cómo todas las proteínas del grupo $\Delta 90$ fueron infecciosas, a pesar de haberse obtenido a partir de semillas no infecciosas.

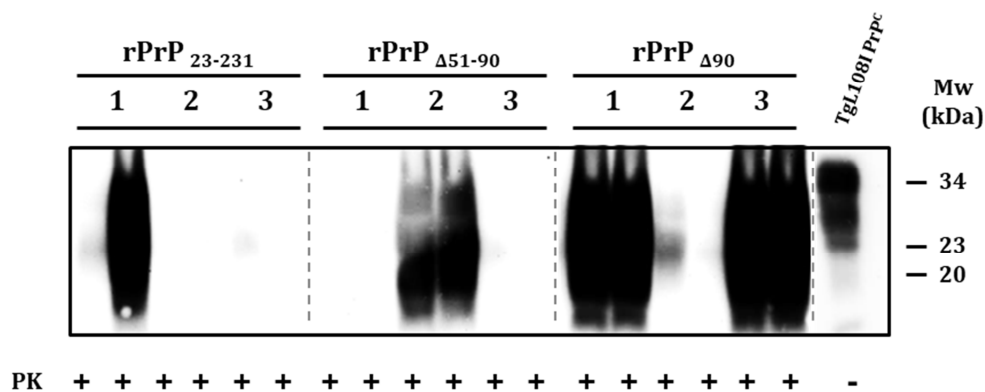


Figura 22. Estudio de infectividad *in vitro* de las recPrP^{res} propagadas en un entorno de dextrano sulfatado. Se utilizaron las muestras obtenidas de la ronda 4 de PMCA del ensayo de infectividad *in vitro* de las 9 semillas espontáneas propagadas en dextrano sulfatado (L108I, $\Delta 51-90$ y $\Delta 90$) y se evaluaron mediante *Western blot*. Todas las proteínas presentaron alguna variante capaz de propagarse en el encéfalo de mamífero; en el caso de la proteína $\Delta 90$, las 3 variantes se propagaron y mostraron infectividad *in vitro*. El sustrato utilizado en la PMCA consistió en un homogeneizado de encéfalo de ratón TgL108I. Todas las muestras se trataron con 170 $\mu\text{g/ml}$ de PK y se analizaron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE. Las membranas se revelaron con el anticuerpo monoclonal Saf83 (1:400). Las líneas punteadas hacen referencia a que las muestras provienen de geles diferentes, pero están ajustadas utilizando el marcador de peso molecular. Mw: del inglés *molecular weight*, peso molecular. PK: Proteínasa K.

Estos resultados sugieren en conjunto, la existencia de una diversidad de variantes conformacionales que aparecerían en distintas proporciones cuando estas se propagan en sustratos complementados con homogeneizados de encéfalo y de las cuales, algunas son capaces de propagarse también en un entorno de dextrano sulfatado.

7.2.2. Estudio de la propagación de proteínas sin región polibásica en un sustrato complementado con dextrano sulfatado

Dado que los resultados previos habían mostrado como la ausencia de la región polibásica parecía tener un efecto sobre la propagación selectiva de ciertas proteínas mal plegadas no infecciosas, se estudió el efecto, supuestamente opuesto, que el dextrano sulfatado parecía tener de propagar selectivamente variantes conformacionales infecciosas. Para este estudio se utilizaron las

semillas que se obtuvieron a través de la propagación de la semilla infecciosa $\Delta 51-90$ (2) utilizando sustratos que contenía las proteínas PrP₂₃₋₂₃₁, PrP _{$\Delta 90$} y PrP _{$\Delta 23-31$} en entorno *Prnp*^{0/0} y que se propagaron posteriormente en sustratos complementados con dextrano sulfatado utilizando proteínas recombinantes homólogas en secuencia (Figura 23).

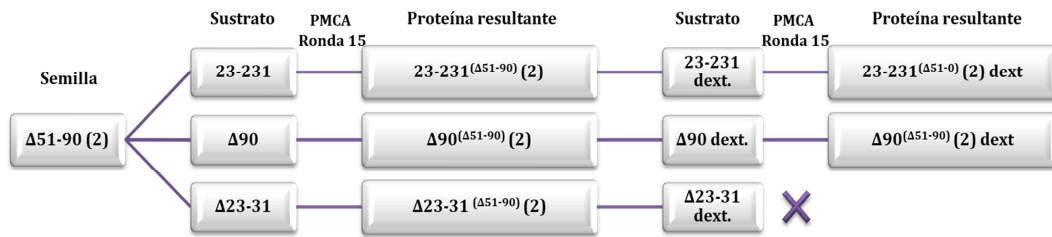


Figura 23. Esquema de la estrategia seguida para estudiar la influencia de la región polibásica y el dextrano sulfatado en propagación e infectividad.

Los resultados muestran que únicamente los sustratos basados en las proteínas PrP₂₃₋₂₃₁ y PrP _{$\Delta 90$} complementados con dextrano sulfatado propagaron la semilla. Las proteínas mal plegadas que se adaptaron después de 15 rondas seriadas de PMCA mostraron un patrón electroforético uniforme y un núcleo resistente a PK de menor peso molecular al que presentan sus semillas originales de las que proceden (figura 24). Además, estos resultados sugieren que la región polibásica podría influir sobre una selección de variantes de las semillas en la propagación previa al dextrano sulfatado. De esta forma, la semilla procedente de la propagación en la proteína $\Delta 23-31$ en entorno *Prnp*^{0/0} habría propagado una determinada variante conformacional incapaz de mantenerse y perpetuarse en un sustrato que, a pesar de estar basado en la proteína recombinante homóloga, estaba complementado con dextrano sulfatado.

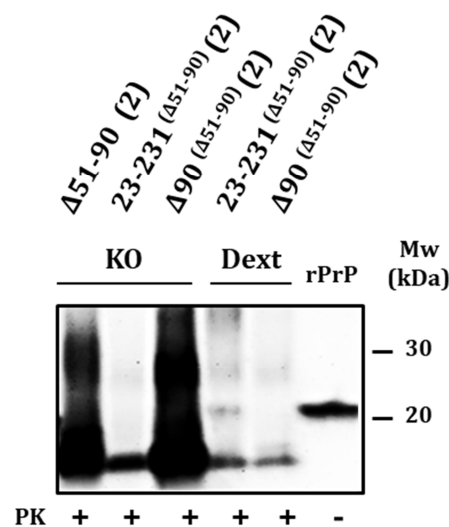


Figura 24. Estudio de la migración electroforética de las dos recPrP^{res} obtenidas después de la propagación de la semilla recPrP^{res} _{$\Delta 51-90$} (2) utilizando un sustrato basado en las proteínas PrP₂₃₋₂₃₁ y PrP _{$\Delta 90$} y sus mismas versiones propagadas en un entorno de dextrano sulfatado. Las semillas obtenidas al propagar $\Delta 51-90$ (2) en sustratos de encéfalo *Prnp*^{0/0} y posteriormente

propagadas en sustratos complementados con dextrano sulfatado basados en las proteínas recPrP₂₃₋₂₃₁ y recPrP_{Δ90} se visualizaron mediante *Western blot*. Las semillas propagadas en sustrato complementado con dextrano sulfatado muestran un patrón de migración de menor peso molecular que las semillas de las que proceden. Las muestras generadas a partir de las semillas originales pertenecen a la ronda 15 de recPMCA. Todas las muestras se trataron con 25 μg/ml de PK y se analizaron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE y *Western blot*. Las membranas se revelaron con el anticuerpo monoclonal Saf83 (1:400). Mw: del inglés *molecular weight*, peso molecular. PK: Proteinasa K.

Aparentemente, las muestras presentan un cambio de patrón una vez que son propagadas en un sustrato complementado con dextrano sulfatado. Concretamente, la semilla PrP^{res}₂₃₋₂₃₁ (PrP^{res}_{Δ51-90}) (2) propagada en un entorno de dextrano sulfatado presenta un fragmento principal de menor peso molecular después de su digestión con PK comparada con la misma proteína mal plegada propagada en un entorno de encéfalo. De la misma forma que se llevó a cabo en el apartado 7.2.1, las semillas adaptadas en un sustrato complementado con dextrano sulfatado se evaluaron a través de la realización del ensayo de infectividad *in vitro* utilizando PMCA de encéfalo (Figura 25).

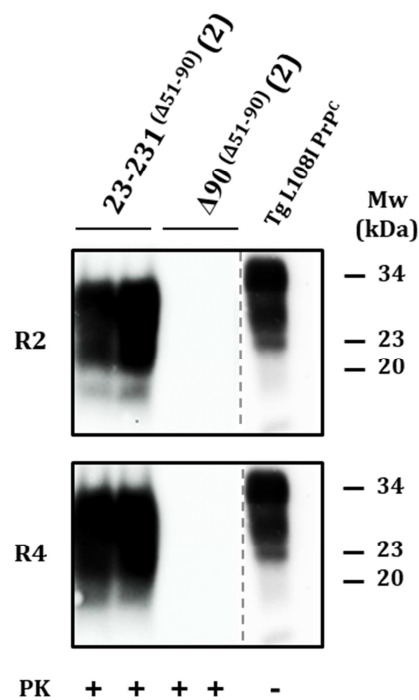


Figura 25. Estudio de infectividad *in vitro* de las recPrP^{res} en un entorno complementado con dextrano sulfatado. Las semillas recPrP^{res}_{Δ90}(PrP^{res}_{Δ51-90}) (2) y recPrP^{res}₂₃₋₂₃₁(PrP^{res}_{Δ51-90}) (2) propagadas en sustratos basados en las proteínas Δ90 y 23-231 complementados con dextrano sulfatado, se evaluaron su infectividad *in vitro* a través de PMCA de encéfalo; las muestras obtenidas de las rondas 2 y 4 se analizaron mediante *Western blot*. La única semilla capaz de propagar y mal plegar la PrP^c de encéfalo de ratón es la que presenta la región N-terminal completa. Todas las muestras se trataron con 170 μg/ml de PK y se analizaron mediante electroforesis en geles SDS-

PAGE. Las membranas se revelaron con el anticuerpo monoclonal Saf83 (1:400). Las líneas punteadas hacen referencia a que las muestras provienen de geles diferentes, pero están ajustadas utilizando el marcador de peso molecular. Mw: del inglés *molecular weight*, peso molecular. PK: Proteínasa K.

Únicamente la proteína mal plegada recPrP^{res}₂₃₋₂₃₁^(PrP^{res} Δ 51-90) (2) en un entorno de dextrano sulfatado mantiene la infectividad de la semilla original de la misma forma que lo hace cuando se propaga en un entorno de encéfalo. Sin embargo, la proteína mal plegada recPrP^{res} _{Δ 90}^(PrP^{res} Δ 51-90) (2) propagada en presencia de dextrano sulfatado, igual que al ser propagada en un entorno de encéfalo, es incapaz de mantener la recPrP^{res} infecciosa detectada en la semilla original. Los resultados obtenidos utilizando las proteínas Δ 90 mal plegadas espontáneamente (todas infecciosas *in vitro* cuando se propagan previamente en un sustrato complementado con dextrano sulfatado) indican que la ausencia de la región N-terminal no determina la infectividad *per se*, si bien parece que la región polibásica podría jugar un papel importante a la hora de favorecer la propagación de determinadas variantes conformacionales frente a otras. Por ello, considerando la región N-terminal como una región selectora o tamizadora de ciertas conformaciones específicas podríamos concluir que en el caso de las proteínas delecionadas en la región polibásica estaríamos ante una doble selección: una efectuada por la región polibásica de la proteína y la segunda selección llevada a cabo por el dextrano sulfatado, que parece favorecer la propagación de conformaciones infecciosas, siempre que se encuentren presentes en la semilla original.

8. Estudio de infectividad utilizando la línea de ratón transgénico TgL108I

Aunque nuestro laboratorio ha establecido previamente una correlación directa entre la infectividad *in vitro* e *in vivo* utilizando proteínas recombinantes del topillo rojo (Fernández-Borges, Di Bari, et al., 2017), esta misma correlación utilizando proteínas de origen murino no se había establecido. Por ello, para confirmar si la recPrP mal plegada, capaz de mostrar infectividad *in vitro*, se propagaba *in vivo* y, por tanto, podría considerarse un prion *bona fide*, la proteína recPrP _{Δ 51-90} (2) se inoculó intracerebralmente en ratones transgénicos que expresan la PrP murina con la mutación puntual L108I y con una sobreexpresión de 3 a 4 veces la expresión de un ratón salvaje. Como control para demostrar susceptibilidad de la línea transgénica, se utilizó este mismo modelo inoculado con RML (del inglés, Rocky Mountain Laboratory), prion ovino (scrapie) adaptado a ratón mediante inoculaciones sucesivas, el cual infectó al 100% de los animales mostrando unos tiempos de incubación de 93(\pm 5) días post inoculación (dpi) \pm SEM. El inóculo recombinante utilizado resultó ser infeccioso *in vivo* con periodos de incubación de 199(\pm 24) dpi \pm SEM, y una tasa de ataque del 100% en el primer pase (Figura 26A). El inóculo recombinante resultó ser más lento que el inóculo RML utilizado como control, que podría explicarse por ser cepas distintas o por la barrera existente entre recombinante y encéfalo.

El análisis de los cerebros de los animales afectados mediante digestión por PK y *Western blot*, mostró acumulación de PrP resistente a proteasa. El patrón de migración electroforético se caracterizó por una señal correspondiente a la PrP mal plegada y digerida por PK de menor peso

molecular que el que presentan los cerebros inoculados con RML, que recordaba al patrón que muestran las cepas de ciertos priones atípicos (Figura 26B). La cantidad de PrP^{res} detectada en los cerebros inoculados con la semilla recombinante fue cuantitativamente menor si comparamos con la intensidad que se obtuvo en los cerebros inoculados con RML, sugiriendo una menor eficiencia de propagación. Uno de los homogeneizados de cerebros presentó un patrón diferente a los otros dos analizados con una sola banda alrededor de los 25 kDa, similar a la banda correspondiente a la PrP diglicosilada característica de priones con patrón clásico, lo cual es un indicador claro de la posible existencia de una mezcla de cepas en la semilla original.

9. Estudio neuropatológico

Los cambios espongiiformes y la distribución de la PrP asociada a enfermedad (PrP^d, d del inglés *disease*) en los cerebros de los ratones transgénicos, inoculados con la semilla recombinante, se observaron a través de ensayos histológicos e inmunohistoquímicos, comparándolos con controles de infectividad (inoculados con RML) y controles negativos (no inoculados) (Figura 26C).

En los encéfalos teñidos con HE se observó una espongiosis evidente en los ratones inoculados con RML y la IHQ reveló depósitos de PrP^{res} (patrón intraneuronal, perineuronal y punteado fino en neuropilo) afectando principalmente al cuerpo estriado, tálamo, mesencéfalo y medula oblongada. En cambio en los cerebros inoculados con el inóculo recombinante se observó una espongiosis más moderada y a través del estudio IHQ se visualizaron depósitos de PrP^{res} (patrón punteado fino y granular en neuropilo) esta vez localizados a nivel de la corteza temporal/parietal, cuerpo calloso y corteza cerebelar, siendo marcadamente distinto en los animales inoculados con RML.

En los tres grupos de animales analizados se observaba un patrón de marcaje de PrP^c perineuronal en algunas regiones, especialmente en la corteza, que se interpreta como sobreexpresión y es distinguible de los depósitos patológicos. Los animales control no mostraron cambios espongiiformes, excepto aquellos debidos a la edad, ni depósitos patológicos de PrP.

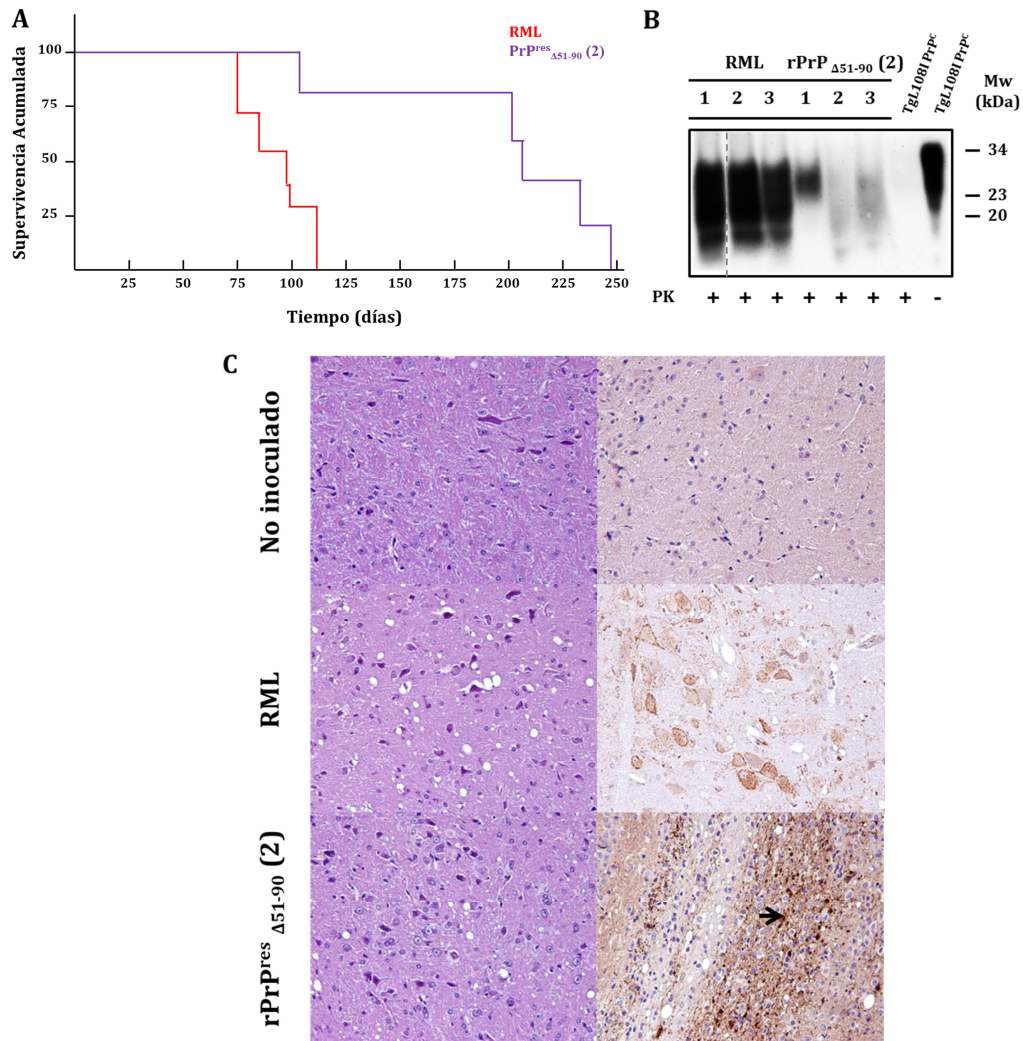


Figura 26. Estudio de la infectividad *in vivo* y ensayo neuropatológico de la recPr^{Pres}_{Δ51-90} (2) en la línea de ratón transgénico TgL108I. A) Gráfico que muestra la supervivencia de los ratones inoculados con RML (rojo) y recPr^{Pres}_{Δ51-90} (2) (morado). El inóculo recombinante presenta una tasa de ataque del 100% aunque con un periodo de incubación más prolongado comparado con el observado con el inóculo RML. **B)** Análisis bioquímico de los homogeneizados de cerebros de los ratones transgénicos TgL108I inoculados con RML (izquierda) y recPr^{Pres}_{Δ51-90} (2) (derecha). El carril anterior al control se muestra el homogeneizado de encéfalo de un ratón de la misma línea transgénica sin inocular y tratado con la misma cantidad de PK que las muestras que provienen de cerebros inoculados. Los homogeneizados de cerebros de los ratones inoculados con recPr^{Pres}_{Δ51-90} (2) presentan un patrón electroforético diferente a los inoculados con RML y una intensidad de señal notablemente menor. Todas las muestras se analizaron a través de *Western blot* y electroforesis en geles SDS-PAGE, y se trataron con 85 µg/ml de PK. Las membranas se revelaron con el anticuerpo monoclonal Saf83 (1:400). Las líneas punteadas hacen referencia a que las muestras provienen de geles diferentes, pero están ajustadas utilizando el marcador de peso molecular. Mw: del inglés *molecular weight*, peso molecular. PK: Proteínasa K. **C)** Caracterización histopatológica: los animales TgL108I inoculados con RML muestran espongiosis y depósitos PrP^d en el mesencéfalo, los inoculados con recPr^{Pres}_{Δ51-90} (2) presentan espongiosis moderada y en la IHQ se observaron depósitos de PrP^{res} evidentes en la corteza parietal (flecha). Se utilizó el anticuerpo monoclonal 2G11 (1:100) para la detección de la PrP^{res}.

DISCUSIÓN

El principal objetivo de esta tesis doctoral es arrojar algo de luz sobre el papel que tienen diferentes secciones de las regiones N-terminal y C-terminal de la proteína priónica en el mal plegamiento, propagación y mantenimiento de propiedades características de cepa *in vitro*. Para ello, se generaron PrPs de ratón recombinantes con distintas deleciones y se estudiaron sus características mediante PMCA.

La PMCA se seleccionó como sistema de propagación *in vitro* debido especialmente a su demostrada correlación con lo que sucede *in vivo*. Además, la PMCA permite el uso de un gran número de diferentes cepas de priones sobre diversas PrP polimórficas y testar así barreras de transmisión difíciles de evaluar *in vivo* (Fernandez-Borges et al., 2009). Sin embargo, la necesidad de utilizar material encefálico que contengan la PrP a estudiar ha limitado el uso de esta técnica a aquellos polimorfismos frecuentes y con fácil acceso a la naturaleza. Situación que se superó gracias a la utilización de proteína recombinante (de fácil preparación en el laboratorio) en la variante denominada recPMCA, permitiendo generar cualquier mutación deseada y testarla de forma rápida (Fei Wang et al., 2010).

La elección de las deleciones estudiadas se basó en trabajos previos desarrollados por otros investigadores. La selección de la región de las octarepeticiones se debió a que Felchsig y colaboradores mostraron en una deleción de la proteína similar ($\Delta 32-93$, octarepeticiones incluidas) tiempos de incubación mayores y título de priones en cerebro y bazo muchos más bajos que los presentados por ratones salvajes en todas las etapas de la enfermedad; con lo que se concluyó que la región de las octarepeticiones no es esencial para mantener la replicación y la enfermedad, pero sí afecta al nivel de acumulación de priones y al patrón de acumulación cerebral (Flechsigt et al., 2000). Las deleciones $\Delta 90$ y $\Delta 141-176$ se fundaron en resultados obtenidos por otros estudios en los que ratones transgénicos, que expresaban el miniprion, presentaron signos clínicos al ser inoculados con RML, además se observó que el miniprion sintético poseía propiedades fisicoquímicas y biológicas similares a las de la PrP^{Sc} lo que le hizo ser una buena herramienta para investigar las bases moleculares de la conversión conformacional de PrP^C a PrP^{Sc} y la biología de las enfermedades priónicas (Baskakov et al., 2000; Bonetto et al., 2002; Supattapone et al., 1999). Finalmente, las proteínas recombinantes con las deleciones $\Delta 23-28$ y $\Delta 23-31$ basan su selección al observar en diferentes estudios de ratones transgénicos, que expresan la PrP delecionada o mutada en la región polibásica, un retraso en la aparición de signos clínicos una vez que son inoculados respecto a los ratones salvajes, además de presentar un comportamiento dependiente de la cepa utilizada (Khalifé et al., 2016; Turnbaugh et al., 2012; Turnbaugh et al., 2011; Westergard et al., 2011b). Para todas estas proteínas la capacidad de mal plegamiento se evaluó de dos formas diferentes: inducido por semilla (recombinante) y espontáneamente. Estas formas de inducción de mal plegamiento modelaría en el primer caso las enfermedades adquiridas, y en el segundo, las enfermedades esporádicas. La elección de una semilla recombinante en lugar de un inóculo proveniente de encéfalo pretendía facilitar el proceso de mal plegamiento eliminando la barrera de transmisión existente entre las proteínas recombinantes y las provenientes de encéfalo,

probablemente debida a las diferencias en modificaciones postraduccionales que presentan. Por otra parte, para favorecer la frecuencia de mal plegamiento espontáneo todas las proteínas se diseñaron con la mutación puntual L108I, equivalente al polimorfismo 109I que presenta la PrP del topillo rojo. La presencia de dicho polimorfismo y la sobreexpresión de la PrP que lo contiene en ratones transgénicos conduce invariablemente al desarrollo espontáneo de una enfermedad priónica (Watts et al., 2014; Watts et al., 2012). Esto se refleja en que efectivamente la introducción de esta mutación en la PrP de ratón aumenta considerablemente su frecuencia de mal plegamiento espontáneo respecto a la proteína salvaje (datos no publicados), observándose similar comportamiento en las delecciones estudiadas (salvo algunas excepciones).

A lo largo de toda esta tesis doctoral se demuestra que las proteínas delecionadas en la región N-terminal mal pliegan tanto inducidas por semilla como de forma espontánea, exceptuando las delecionadas en la región polibásica que solo presentan mal plegamiento inducido por semilla. Sin embargo, las proteínas delecionadas en la región C-terminal no muestran capacidad de mal plegamiento a una forma resistente a PK. Todas las proteínas mal plegadas presentan una alta eficiencia de propagación en sustratos que contienen la misma proteína. Sorprendentemente se observó que, a pesar de utilizar siempre las mismas proteínas y condiciones experimentales se generaron semillas distinguibles por movilidad electroforética tras la digestión con PK y por distinta infectividad *in vitro*. Estas diferencias sugieren la existencia de distintas estructuras proteicas, probablemente mezclas de varias en cada semilla, seleccionándose o favoreciéndose unas u otras conformaciones mayoritarias dependiendo de los cofactores o el entorno presente en el sustrato que se utiliza para su propagación.

Uno de los resultados más llamativos fue el no obtener mal plegamiento de las proteínas delecionadas en la región C-terminal, puesto que en animales transgénicos expresando la misma delección se consiguió transmisión, propagación y causar enfermedad neurodegenerativa al ser inoculados con RML. Además, estos animales mostraron tiempos de incubación más cortos cuando eran inoculados con homogeneizado de cerebros de animales que expresaban la delección de estudio y que habían sucumbido a la infección por RML (Supattapone et al., 1999). Sin embargo, este miniprion no reúne todas las características relacionadas con un prion *bona fide* puesto que en ensayos *in vivo* es incapaz de mal plegar la proteína priónica de ratón salvaje y las lesiones neuropatológicas no concuerdan completamente con las de una encefalopatía espongiiforme. Esta ausencia de mal plegamiento en las proteínas recombinantes que portan la delección $\Delta 141-176$ podría deberse a que el mal plegamiento que muestra el miniprion *in vivo* sea realmente un estado intermedio y no PrP^{Sc}, es decir, que consista en un intermediario de la ruta de formación de PrP^{Sc}. Además, parece ser que la estructura de la PrP^C cambia cuando se une a la proteína X y que este es el paso limitante en la formación de la PrP^{Sc} (Kaneko et al., 1997); por ello, estas proteínas delecionadas en su región C-terminal al adquirir una estructura intermediaria, podrían verse impedidas en la interacción con la proteína X, no pudiendo asistir la conversión (Fei Wang et al., 2010) y como resultado no dar nunca una estructura estable y resistente a PK en ensayos *in vitro*.

Los últimos hallazgos por Wu y colaboradores (Wu et al., 2017), en los que muestran claras evidencias de que los dominios N- y C-terminal de la PrP^C están acoplados funcionalmente, exponen que si se interrumpe este acoplamiento tiene lugar una desregulación proteica y la interrupción de la neurotoxicidad mediada por el dominio N-terminal, lo que podría ser otra explicación por la cual las proteínas recombinantes delecionadas en la región C-terminal son incapaces de mal plegar *in vitro*, debido a la necesidad de acoplamiento entre las regiones C- y N-terminal para el proceso de mal plegamiento. Otro factor relevante que podría explicar las diferencias observadas entre el modelo *in vivo* y el modelo *in vitro* en el caso del miniprion son las modificaciones postraduccionales de la PrP de encéfalo frente a la recPrP. La ausencia de glicosilaciones y anclaje mediante GPI de la proteína utilizada en PMCA podrían influir negativamente en la capacidad de mal plegamiento a la isoforma resistente a PK de las proteínas recombinantes delecionadas en la región C-terminal. No cabe duda que la PMCA representa una gran herramienta para estudiar i) la biología de los priones, ii) el mecanismo de la transmisión de priones, iii) la barrera de especies, iv) el fenómeno de cepa, v) la eficacia de un procedimiento de descontaminación y vi) la eficacia de compuestos terapéuticos para interferir en la propagación de priones. No obstante, existen numerosas investigaciones en las que se observan diferencias entre los resultados obtenidos por PMCA sobre todo basada en PrP recombinante y la experimentación *in vivo*. Kim y colaboradores mostraron por ejemplo, cómo la ausencia de GPI tanto en PrP recombinante como en purificada de encéfalo y tratada con PI-PLC (phosphatidylinositol-specific phospholipase C) impedía el mal plegamiento a PrP^{res} inducido por semilla en PMCA, mientras que la PrP^C con GPI propagaba perfectamente una cepa obtenida de animales afectados (J.-I. Kim, Surewicz, Gambetti, & Surewicz, 2009). En estudios posteriores, a pesar de que fueron capaces de mal plegar la misma PrP recombinante consiguiendo priones infecciosos, éstos no conservaban las características propias de la semilla después de propagarse *in vitro*, fenómeno que podría deberse a la ausencia de modificaciones postraduccionales, que podrían ser relevantes a la hora de mantener las propiedades de cepa (J. I. Kim et al., 2010). Un estudio publicado por Yuan y colaboradores, en el que una PrP recombinante humana expresada en *E.coli* parece inhibir el mal plegamiento por PMCA de la misma PrP humana expresada en el encéfalo de un ratón transgénico, apunta en una dirección similar. Sus resultados sugieren la existencia de una barrera de transmisión entre la PrP recombinante y la de encéfalo, que impide o dificulta la conversión a PrP^{Sc} probablemente por la ausencia de GPI y glicosilaciones de la PrP recombinante (Yuan et al., 2013). Estos ejemplos se basan sobre todo en la barrera existente entre la PrP recombinante y de encéfalo en PMCA, pero reflejan que el sistema de propagación *in vitro* a través de PMCA a pesar de sus muchas ventajas podría no reflejar de forma eficiente lo que ocurre en un organismo vivo. A pesar de las diferencias, la recPMCA está demostrando ser un buen modelo para el estudio del mal plegamiento *in vitro*, salvo para la región de anclaje al GPI, ya que modela eficientemente la tendencia incrementada al mal plegamiento de las PrPs con mutaciones hereditarias (Elezgarai et al., 2017), el comportamiento de especies cuya PrP presenta resistencia al mal plegamiento y las barreras de especies (Eraña et al., 2017; Fernández-Borges, Parra, et al., 2017); y la formación de nuevas y distintas cepas (Fernández-Borges, Di Bari, et al., 2017).

Además de la capacidad de mal plegamiento inducido por una semilla recombinante, cuyos resultados podrían tener una utilidad menor para extrapolaciones a lo que sucede *in vivo* por el uso de PrP recombinante, también se quiso evaluar la influencia de las deleciones en la capacidad de mal plegamiento espontáneo de estas PrPs. Por este motivo, se seleccionó la mutación puntual L108I ya que esta posición ha demostrado cierta relevancia en el mal plegamiento espontáneo en otras especies. Este es el caso del topillo rojo, que presenta este polimorfismo de forma natural. Esta especie puede presentar Isoleucina o Metionina en la posición 109 (equivalente a la posición 108 de la PrP de ratón), en el cual se ha observado que la presencia de isoleucina favorece el mal plegamiento espontáneo tanto *in vivo* como *in vitro* que lleva al desarrollo de una EET esporádica (Fernández-Borges, Di Bari, et al., 2017; Watts et al., 2012). Además, esta misma variante polimórfica dio lugar al modelo de enfermedad priónica *in vivo* con el menor tiempo de incubación descrito a través de la transmisión de una cepa de EDC (Di Bari et al., 2013). Solamente dos de las proteínas delecionadas presentaron capacidad de mal plegamiento espontáneo (aparte de la proteína completa con la mutación puntual L108I utilizada como control), en concreto, las proteínas sin la región de las octarepeticiones y la que presentaba los primeros noventa aminoácidos delecionados. Tanto por trabajos previos en nuestro laboratorio (Fernández-Borges, Di Bari, et al., 2017) como por lo observado en esta tesis doctoral, se intuye que el mal plegamiento espontáneo es un proceso estocástico aunque reproducible, probablemente dependiente de la formación arbitraria de los núcleos de agregación (Baskakov, 2007; Masel et al., 1999). Este hecho queda patente tras analizar los duplicados tanto intra como interexperimentales, ya que, ni todos los tubos utilizados en un experimento y sometidos a las mismas condiciones metodológicas sufrían el mal plegamiento en la misma ronda de recPMCA, ni dos experimentos independientes daban lugar a mal plegamientos espontáneos en rondas idénticas de recPMCA. Cabe destacar que las proteínas que presentan $\Delta 23-28$ y $\Delta 23-31$, no pudieron mal plegarse espontáneamente mientras que sí lo hicieron inducido por una semilla recombinante de PrP de ratón con la mutación L108I. Esto sugiere que ciertas regiones de la zona N-terminal podrían ser las responsables de modular o dirigir la capacidad de mal plegamiento espontáneo, mientras que la deleción en la región C-terminal abrogaría completamente su capacidad de mal plegamiento. La ausencia de isoformas resistentes a PK espontáneamente en estas dos proteínas recombinantes portadoras de las deleciones en la región polibásica concuerda con experimentos previos en los que ratones transgénicos que expresaban proteínas delecionadas en la región N-terminal pero que mantenían dicha región [$\Delta 32-121$ y $\Delta 32-134$ (Shmerling et al., 1998), $\Delta 94-134$ (Baumann et al., 2007), y $\Delta 105-125$ (A. Li, Christensen, et al., 2007)] inducían una enfermedad neurológica espontánea. Realmente el mecanismo de mal plegamiento espontáneo de las proteínas priónicas es desconocido. Aunque puede estar favorecida por ciertas mutaciones o polimorfismos (Jackson et al., 2009; Watts et al., 2012) y conseguirse *in vitro* (Barria, Mukherjee, Gonzalez-Romero, Morales, & Soto, 2009), aún no es posible predecir la propensión de ciertas PrPs a mal plegarse de forma espontánea. Los resultados obtenidos acerca de la capacidad de mal plegamiento espontáneo de las proteínas delecionadas sugieren que la presencia de la región polibásica puede ejercer un efecto significativo sobre la capacidad de mal plegamiento espontáneo de la proteína. En el caso de la deleción $\Delta 90$, la

presencia de la cola de histidinas y de la secuencia de corte por proteasa podría suplantar la función que los aminoácidos de la región polibásica desempeñan a la hora de promover el mal plegamiento espontáneo.

A causa de la incapacidad de las proteínas portadoras de la delección $\Delta 141-176$ para mal plegarse, tanto inducida por la semilla recPrP^{res} L108I como de forma espontánea, se utilizaron las semillas recombinantes obtenidas espontáneamente con las proteínas que contenían las delecciones $\Delta 51-90$ y $\Delta 90$ (recPrP^{res} $_{\Delta 51-90}$ y recPrP^{res} $_{\Delta 90}$). De la misma forma que se había observado hasta el momento, las delecciones de la región C-terminal no pudieron mal plegarse con ninguna de las semillas. Sin embargo, las proteínas recPrP $_{\Delta 23-28}$ como recPrP $_{\Delta 23-31}$ (incapaces de mal plegar de forma espontánea) mal plegaron de una forma más eficiente que cuando se indujo el mal plegamiento con la semilla recPrP^{res}L108I. Este hecho recuerda a lo que Khalifé y colaboradores demostraron a través de ratones transgénicos que expresaban la PrP ovina con una delección de los residuos 23 al 26 o mutada (KQHPH en lugar de KKRPK) en los mismo residuos. En este estudio presentaron una susceptibilidad variable dependiente de la cepa de priones que se utilizara para inducir el mal plegamiento (Khalifé et al., 2016), con lo que esta región podría estar implicada en el mal plegamiento dependiente de cepa o ser responsable del mantenimiento de las características de cepas. Las PrP^{res} generadas espontáneamente a partir de las proteínas delecionadas $\Delta 51-90$ y $\Delta 90$, podrían generar estructuras o conformaciones diferentes a las que se encuentran en la semilla PrP^{res} L108I utilizada en un primer momento (no solo por la diferencia de aminoácidos), las cuales poseen una mayor afinidad y presentan una capacidad mayor de inducir mal plegamiento en estas proteínas delecionadas en la región polibásica. Situación semejante obtienen en ratones transgénicos carentes de la región de las octarepeticiones e inoculados con RML, 22L y BSE, presentando tiempos de incubación diferentes dependientes de la cepa priónica utilizada (Hara et al., 2017).

Con el fin de disponer una mayor variabilidad tanto bioquímica como biológica en las PrP recombinantes mal plegadas *in vitro*, se seleccionaron distintas muestras por mostrar diferencias en sus patrones de migración electroforética, reflejo de diversidad conformacional. Así fue como tres variantes de las proteínas PrP $_{23-231}$, PrP $_{\Delta 51-90}$ y PrP $_{\Delta 90}$ fueron seleccionadas para estudiar en más detalle sus características bioquímicas. La diferencia electroforética mostrada concretamente se basaba en presentar pesos moleculares diferentes una vez que las semillas eran tratadas con PK a pesar de presentar secuencias aminoácidas iguales y de haber sido producidas de la misma forma y siguiendo la misma metodología. Algo muy semejante puede observarse en los resultados publicados recientemente por el laboratorio de Ma y colaboradores (Fei Wang et al., 2017), en el que obtienen una semilla no infecciosa cuyo patrón electroforético es de menor peso molecular (rPrP-res^{RNA-low}) en comparación con la generada anteriormente (mismas condiciones) en presencia de RNA procedente de hígado de ratón y POPG [lípidio 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-sn-glicerol)] sintético, y que se convirtió utilizando PMCA sin semilla en un prion recombinante altamente patogénico (rPrP-res^{RNA}) (Fei Wang et al., 2010). El grupo de Priola ya observó una

generación de cepas diferentes siguiendo el mismo procedimiento metodológico, en este caso la diferencia no fue en los patrones electroforéticos presentados una vez tratada la proteína con PK, sino en la infectividad (Timmes et al., 2013). La generación de distintas cepas *in vitro* no sería extraño de acuerdo con lo propuesto por Weissmann y colaboradores (Weissmann, Li et al 2011) entre otras evidencias más actuales (Fernández-Borges, Di Bari, et al., 2017); fue lo que animó a realizar un estudio más detallado y evaluar la posible influencia de las distintas delecciones de la región N-terminal en el mantenimiento de las diferentes características que presentaba cada semilla.

Con el propósito de llevar a cabo un exhaustivo estudio bioquímico de estas 9 variantes generadas espontáneamente se empezó por evaluar su capacidad propagativa. Una de las principales características que definen una cepa de prion es su capacidad de propagación tanto *in vivo* como *in vitro* a expensas de PrP con la misma secuencia aminoacídica. Por ello, las proteínas mal plegadas espontáneamente se sometieron a recPMCA por dilución en sustratos que contenían la misma PrP tras igualar las cantidades iniciales de PrP^{res} en cada semilla como de las distintas PrPs que conforman cada sustrato. Todas las proteínas mal plegadas se propagaron de forma altamente eficiente en sus sustratos, detectándose PrP^{res} en todas hasta con diluciones de semilla en sustrato de hasta 10^{-11} – 10^{-12} . El hecho de que las diferentes semillas muestren capacidades de propagación tan similares independientemente de las distintas capacidades de mal plegamiento mostradas por cada secuencia aminoacídica (espontáneamente o inducida por semilla) demuestra claramente la escasa correlación entre la capacidad de mal plegamiento de una determinada PrP y su capacidad de inducir el mismo cambio conformacional en otras PrPs una vez mal plegada. De hecho, la capacidad de inducir el mal plegamiento de una PrP^{res} determinada es una característica propia de cada cepa o variante conformacional, por lo que la ausencia de diferencias entre las capacidades de propagación *in vitro* de las distintas semillas podrían sugerir que comparten una conformación similar y por consiguiente que se trata de la misma cepa. Viendo que las semillas seleccionadas eran totalmente indistinguibles según su capacidad propagativa en su propio sustrato se decidió analizar en mayor detalle otra de las propiedades bioquímicas distintivas de las diferentes variantes como es el patrón de resistencia a PK (Colby, Giles et al. 2009). Las diferencias en la resistencia a PK determinan en ocasiones la presencia de distintas cepas de priones ya que distintas conformaciones dan lugar a diferentes zonas de las proteínas expuestas y accesibles a proteasa. Las diferencias en el patrón de movilidad electroforética que presentaban las distintas semillas generadas a partir de PrPs con una misma secuencia aminoacídica apuntaban a diferencias en su estructura terciaria/cuaternaria que podrían reflejarse en resistencia dispar a la digestión por proteínasa K. Sin embargo, a pesar de que las proteínas mal plegadas estudiadas presentaban distintas delecciones en la región N-terminal, todas ellas mostraron una resistencia similar a la digestión con proteínasa K, siendo resistentes a concentraciones de hasta 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PK. Este comportamiento similar de las diversas proteínas mal plegadas ante la exposición a concentraciones crecientes de PK junto con sus capacidades de propagación también similares;

sugiere que, de haber diferencias conformacionales no son distinguibles mediante los procedimientos elegidos.

Otra característica propia de cepa que podría revelar diferencias entre las recPrP mal plegadas generadas, es su capacidad de inducir mal plegamiento sobre la PrP de encéfalo (relacionado con la infectividad que mostrarían *in vivo*) y su capacidad de propagación al enfrentarse a barreras de transmisión (es decir, la capacidad de inducir mal plegamiento sobre PrPs con secuencias aminoacídicas diferentes). Debido a que la PMCA seriada basada en homogeneizados de encéfalos como sustrato ha demostrado ser un fiel reflejo y correlacionar con lo que sucede *in vivo*, además de ser especialmente útil en el estudio de las barreras de transmisión (Castilla, Gonzalez-Romero, et al., 2008; Saa et al., 2012), y apoyándonos en resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio (Fernández-Borges, Di Bari, et al., 2017), decidimos utilizarlo con el fin de comprobar si las recPrP^{res} seleccionadas mostraban alguna diferencia en este aspecto. Para ello, se llevó a cabo un ensayo de infectividad *in vitro* utilizando encéfalos provenientes de ratones transgénicos que sobreexpresan 3-4 veces la PrP de ratón con la mutación puntual L108I como sustrato. Mediante esta técnica pudimos observar una diferencia al menos entre las variantes de la proteína PrP_{Δ51-90}, en concreto sólo la variante 2 presentó infectividad *in vitro* y mostró capacidad de mal plegar la PrP^C de ratón, eludiendo la barrera existente entre PrPs recombinantes y PrPs de encéfalo. Este hecho coincide con la mayoría de estudios en que se generan PrP^{res} *in vitro*, ya que la mayoría no resulta en patología priónica después de la inoculación en animales susceptibles, confirmando que la adquisición de resistencia a PK y capacidad auto-propagativa no son suficientes para hacer de una proteína mal plegada un prion infeccioso (Baskakov et al., 2000; Baskakov et al., 2002; Baskakov, Legname, Prusiner, & Cohen, 2001; A F Hill, Antoniou, & Collinge, 1999). De ahí que las proteínas recombinantes mal plegadas propagadas o generadas espontáneamente *in vitro* y que se seleccionan por su resistencia a PK y su capacidad auto-propagativa, presentan una capacidad infecciosa variable (Timmes et al., 2013; Fei Wang et al., 2010). Así, algunas son altamente infecciosas mientras que la mayoría no lo son en absoluto. Vale la pena mencionar que, varios estudios apoyan que las propiedades infectivas de la proteína priónica están dictadas por su conformación *per se* (Benetti & Legname, 2009; Colby et al., 2009; Collinge & Clarke, 2007) y que la N-glicosilación parece tener un mínimo papel (Tuzi et al., 2008). Por ello, a pesar de estar induciendo mal plegamiento de la misma secuencia aminoacídica, muchos son los factores que podrían influir y dirigir la obtención de una conformación proteica determinada y, por ende, producir infectividad o no. Esto se observó en ratones transgénicos sin GPI inoculados y por tanto con una PrP^C pobre o casi sin glicanos, cuyos agregados de PrP^{Sc} mostraron grandes cambios morfológicos (Aguilar-Calvo et al., 2017). Las recPrP *in vitro* podrían estar en esta situación, ya que al no tener ninguna clase de restricción podrían adquirir conformaciones más variadas que las adquiridas por las proteínas *in vivo*.

Si bien una de las proteínas mal plegadas delecionadas en la región de las octarepeticiones fue infectiva *in vitro*, ninguna de las Δ90 lo fueron. Valiéndonos de ésta característica distintiva,

quisimos estudiar en profundidad el papel de la región N-terminal de la proteína priónica en el mantenimiento de las características de cepa, principalmente infectividad. Para ello, se evaluó la infectividad *in vitro* de las proteínas mal plegadas utilizando la semilla PrP_{Δ51-90} (2) sobre sustratos que contenían las proteínas Δ90, Δ23-28 y Δ23-31, cuya diferencia más importante respecto a la semilla es la ausencia de la región polibásica. A pesar de que se observó recPrP^{Pres} con todas estas proteínas sugiriendo que podían haber propagado la semilla eficientemente, ninguna de ellas fue capaz de mantener la infectividad de la semilla original. Estos resultados podrían tener tres interpretaciones: i) Aunque la zona polibásica no es esencial para propagar ciertas variantes conformacionales (no infecciosas) sería necesaria para propagar otras estructuras (infecciosa) que se verían fácilmente superadas por las primeras. Este resultado implicaría que en una misma semilla se están manejando siempre mezclas de proteínas recombinantes con mal plegamientos ligeramente distintos, pero con un gran impacto sobre sus propiedades biológicas y la zona polibásica seleccionaría preferentemente alguna de ellas (no infecciosa). La selección de variantes conformacionales *in vitro* ha sido demostrada utilizando inhibidores de propagación, que ejercen una presión selectiva que da lugar a cepas resistentes a la acción del inhibidor (Oelschlegel & Weissmann, 2013; Shorter, 2010). ii) otra explicación podría ser que la ausencia de zona polibásica impusiera un cambio conformacional durante la propagación tal y como sucede cuando se cruzan barreras interespecíficas y la cepa resultante adquiere propiedades distintivas del prion original (Bartz, Bessen, McKenzie, Marsh, & Aiken, 2000), o como ocurrió en experimentos con fibras sintéticas que la coexistencia de una ínfima cantidad de PrP_{Δ23-21} con la proteína completa en clara mayoría desencadena un gran impacto en la conformación y morfología de las fibras que se forman (Ostapchenko, Makarava, Savtchenko, & Baskakov, 2008) ii) O podría ser que aun habiendo propagado fielmente el mal plegamiento de la semilla original, la nueva semilla carente de región polibásica sea no infectiva *per se*, es decir, que dicha región sea necesaria para la propagación a expensas de la PrP de encéfalo. En cualquier caso, tanto por selección como por modificación de las variantes estructurales como por ausencia de una región crítica, parece que el resultado final es que ninguna de las proteínas mal plegadas sin región polibásica es infecciosa. La ausencia de infectividad en proteínas sin los aminoácidos 23-31 coincide con estudios previos en los que demuestran que la región polibásica en el extremo N-terminal de la proteína, concretamente los residuos aminoácidos que abarcan del 23-31, son esenciales para la toxicidad de la PrP (Turnbaugh et al., 2011; Westergard et al., 2011b). Además, Turnbaugh y colaboradores mostraron que ratones transgénicos que expresan la proteína del prion con los residuos del 23-31 delecionados son menos susceptibles a la infección por priones y acumulan niveles bajos de PrP^{Sc} (Turnbaugh et al., 2012). Así, proponen que los residuos 23-31 representan un sitio de interacción crítico entre la PrP^C y PrP^{Sc} y por tanto, son esenciales para una propagación priónica eficiente; asimismo, recientemente se ha demostrado que el dominio N-terminal de la PrP^C funciona como un poderoso efector de transducción de toxicidad cuya actividad está estrechamente regulada por el dominio C-terminal (Wu et al., 2017). De esta forma, se explicaría por qué nuestras semillas generadas a partir de una semilla infecciosa pierden esa infectividad al tener delecionada la región polibásica. Por otra parte, una clara evidencia de la importancia de la región polibásica es su alta

conservación entre las especies de mamíferos y la cantidad de funciones relacionadas con ella, como la regulación de la endocitosis de la PrP (S.-L. Shyng et al., 1995; Sunyach et al., 2003; Taylor, Watt, Perera, & Hooper, 2005), la unión a glicosaminoglicanos (T. Pan et al., 2002; Taubner, Bienkiewicz, Copié, & Caughey, 2010; Warner, Hundt, Weiss, & Turnbull, 2002) y la capacidad de actuar como un dominio de transducción de proteínas (Wadia et al., 2008).

Con el fin de diferenciar si la pérdida de infectividad de las proteínas mal plegadas generadas a partir de una semilla infectiva se debía a la ausencia de la región polibásica en estas nuevas o estaba asociada a una acción selectiva inducida por esta misma región [posible mezclas de estructuras dentro de la misma semilla (Fernández-Borges, Di Bari, et al., 2017)], se propagaron las semillas a expensas de sustrato basado en la proteína completa del prión. Si la ausencia de la región polibásica es la causante de la pérdida de infectividad cabría esperar una recuperación de la infectividad de todas aquellas semillas procedentes de la propagación de la proteína mal plegada PrP^{res}_{Δ51-90} (2), de lo contrario si la región polibásica actuase como selector de determinadas variantes conformacionales, la infectividad podría no rescatarse. Según los resultados obtenidos y la ausencia de infectividad de las nuevas proteínas mal plegadas sin deleciones, parece que esta región sería indispensable para propagar fielmente el mal plegamiento de la semilla, ya sea por selección o modificación. Con lo que la región polibásica podría tener un importante papel selector de la mezcla de variantes conformacionales existentes en las semillas propagadas en sustratos que contenían proteínas carentes de la región polibásica. Algo semejante defienden Sakaguchi y colaboradores, ya que afirman que los residuos 25-50 no son esenciales para la conversión de la PrP^C a PrP^{Sc} al observar que ratones que expresan esta proteína delecionada fueron infectados con determinados priones. Sin embargo, podría afectar a la conversión de PrP^C a PrP^{Sc} de forma dependiente de cepa, contribuyendo a una susceptibilidad diferente dependiendo de la cepa utilizada en la inoculaciones (Das et al., 2017). Por otro lado, Turnbaugh y colaboradores demuestran que la eliminación de estos residuos comprometió notablemente la capacidad de la PrP^C para servir como sustrato a la hora de mal plegarse en presencia de PrP^{Sc}, y los ratones transgénicos que expresan la PrP Δ23-31 mostraron un aumento espectacular de la supervivencia después de la inoculación con scrapie, acumulando cantidades reducidas de PrP^{Sc} en sus cerebros. Además, sus ensayos bioquímicos indican que este fenómeno es consecuencia de la capacidad reducida de las semillas de PrP^{Sc} para unirse la PrP^C carente de región polibásica, lo que demuestra que esta región podría estar implicada en los pasos iniciales de formación del complejo PrP^C – PrP^{Sc} (Turnbaugh et al., 2012). Esto implicaría que, de una mezcla de variantes en una misma semilla (como serían nuestras semillas) sólo aquellas variantes conformacionales capaces de interactuar de forma eficiente con la PrP^C delecionada que actúa como sustrato podrán seleccionarse, perpetuarse y propagarse; siendo esta selección totalmente independiente de la capacidad infectiva de la variante seleccionada. Por otro lado, Turnbaugh y colaboradores quisieron comprobar que sus transgénicos con la deleción 23-31 eran igualmente mal plegables *in vitro* que lo observado *in vivo*. Para ello, realizaron PMCA utilizando encéfalos de ratón como sustrato y con RML como inóculo y observaron que la eficiencia de mal plegamiento de esta proteína era reducida (Turnbaugh et al.,

2012). Algo similar podría haber ocurrido con las proteínas estudiadas en esta tesis doctoral, a los que además, habría que sumarle las diferencias entre proteínas recombinantes y las PrP de encéfalo, cuyo comportamiento podría ser diferente. También cabe resaltar que, estudios en los que mutaciones puntuales en los residuos pertenecientes a la región 23-33 (Abalos et al., 2008) o la delección de los residuos 23-88 (Rogers, Yehiely, Scott, & Prusiner, 1993), no evitaron la formación de PrP^{Sc} en células de neuroblastoma, aunque la eliminación de los residuos 23-28 en la PrP^C disminuyó la unión a PrP^{Sc} y afectó la conversión en PMCA (Miller, Geoghegan, & Supattapone, 2011). Estos hallazgos sugieren que la conversión y propagación de estas proteínas portadoras de delecciones en la región polibásica podrían ser menos eficientes en sistemas *in vitro*. Asimismo, varias líneas de evidencia indican que la propagación de PrP^{Sc} implica dos pasos mecánicamente distintos: la unión de la PrP^{Sc} de la semilla a la PrP^C del sustrato seguida de un cambio conformacional, dando como resultado la formación de PrP^{Sc} (DeBurman et al., 1997; Horiuchi & Caughey, 1999). Mientras que otros resultados dejan abierta la posibilidad de que los residuos 23-31, además de formar un sitio de unión para la PrP^{Sc}, también pueden mediar la interacción con cofactores que influyen en la reacción de conversión, como polianiones o lípidos (N. R. Deleault et al., 2007; Turnbaugh et al., 2012; Fei Wang et al., 2010). Por todo ello se conjetura que la unión entre PrP^C y PrP^{Sc} es asimétrica: el dominio polibásico de la PrP^C constituye un sitio de acoplamiento crítico para la PrP^{Sc}, pero una vez que las dos moléculas se unen, la conversión conformacional podría regularse por los residuos pertenecientes al núcleo resistente a proteasas independientemente de la región polibásica. Por lo tanto, la convertibilidad de la PrP^C y la infectividad de la PrP^{Sc} se regirían por diferentes dominios de la cadena polipeptídica. Esta suposición apoyaría a lo que ocurre cuando nuestra semilla PrP_{Δ51-90} (2) (mezcla de infecciosas y no infecciosas) se propaga a expensas de sustratos que contienen PrPs carentes de la región polibásica, propagando variantes más eficientes independientemente de la infectividad de las mismas.

Asumiendo que en el proceso de generación espontánea de proteínas mal plegadas se obtienen mezclas con propiedades bioquímicas y biológicas distintivas (Fernández-Borges, Di Bari, et al., 2017) y debido a la observación de que el extremo N-terminal en un entorno de encéfalo de ratón podría actuar como tamizador permitiendo propagar únicamente determinadas conformaciones, se estudiaron diferentes entornos (sustratos que contiene recPrP complementada con cofactores específicos en lugar de la mezcla de cofactores presente en un homogenizado de cerebro completo) con el fin de evaluar su potencial capacidad para seleccionar variantes conformacionales infecciosas. La técnica de la PMCA ha sido utilizada durante más de 10 años para propagar priones aislados de mamíferos *in vitro* (Fernandez-Borges et al., 2009) y ha sido adaptada para permitir el uso de proteínas priónicas recombinantes expresadas en bacterias como fuente de PrP^C de los sustratos que se utilizan para la propagación de priones (Fernández-Borges, Eraña, et al., 2017). La propagación de proteínas recombinantes mal plegadas con propiedades infecciosas comenzó con la primera generación de priones recombinantes sintéticos (Legname et al., 2004). Estudios posteriores realizados mediante recPMCA han proporcionado mucha información sobre la replicación de priones al revelar los componentes mínimos necesarios para la generación de

priones *bona fide in vitro*. Varios estudios indicaban que los lípidos y polianiniones como el ARN podían ser cofactores necesarios para dar lugar a priones infecciosos *in vivo* (N. R. Deleault et al., 2007; Fei Wang et al., 2010), mientras que otros estudios sugerían que no se requería ningún cofactor (J. I. Kim et al., 2010). Sin embargo, el papel de los cofactores en la infectividad de los priones no se encuentra aun totalmente aclarado, aunque parecen jugar un papel importante. Por este motivo, varios estudios fundamentales se centraron en la búsqueda de la forma de obtener priones infecciosos de forma consistente *in vitro* modificando los sistemas de propagación o mediante la adición de distintos cofactores (Choi et al., 2016; N. R. Deleault et al., 2007; Makarava et al., 2010; Fei Wang et al., 2010). En todos estos estudios se generaron PrP recombinantes mal plegadas con grados muy variables de infectividad, desde lo que mostraron baja infectividad requiriendo de un segundo pase en un modelo animal altamente susceptible (Legname et al., 2004), hasta los que resultaron ser altamente infecciosos y comparables con los priones naturales aislados de mamíferos (Fei Wang et al., 2010). Aunque los últimos datos revelan que los cofactores no son necesarios para la generación de priones *bona fide in vitro*, también muestran que la presencia de diversos cofactores en la propagación o generación de priones recombinantes influye en sus características y propiedades bioquímicas y biológicas (Fernández-Borges, Di Bari, et al., 2017). Por ello, se decidió utilizar sustratos complementados con encéfalos de pollo y con dextrano sulfatado para evaluar el efecto que tendría un cambio de cofactores sobre las propiedades de los priones recombinantes propagados sobre las PrPs con deleciones en el extremo N-terminal. El uso de sustratos complementados con encéfalos de pollo, responde a la observación de que presenta mayor eficiencia de propagación por dilución seriada de inóculo que los sustratos complementados con encéfalo de ratón *Prnp^{0/0}*. Además, la PrP de pollo no interfiere con el mal plegamiento de otras PrPs así que podría atribuírsele una mayor eficiencia en la propagación de las semillas recombinantes (datos no publicados), debido a la existencia de cofactores que se encontrarían en cantidades diferentes o incluso ser específicos. Para ello, las semillas PrP_{Δ51-90} (2) y (3) se propagaron en sustrato basado en homogeneizado de encéfalo de pollo. Ambas variantes conformacionales mantienen sus propiedades bioquímicas aparentes y una vez comprobadas sus propiedades biológicas se observó que la única variante que seguía siendo infecciosa era la proteína mal plegada PrP_{Δ51-90} (2). Así que puede determinarse que el homogeneizado de encéfalo de pollo no influye de ninguna forma en estas proteínas (ni en la propagación ni en sus propiedades bioquímicas ni biológicas) y que su proporción de componentes o la diferencia de los mismos respecto al homogeneizado de encéfalo de ratón *Prnp^{0/0}* no ejercen una presión selectiva diferente a la que ejerce el entorno original y, por tanto, no favorece la propagación de variantes específicas. Referente al dextrano sulfatado, estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que el dextrano sulfatado añadido al sustrato, tiene la propiedad de actuar como un cofactor que permite la propagación de únicamente ciertas variantes conformacionales (Fernández-Borges, Di Bari, et al., 2017). De esta forma, se propagaron las 9 variantes mal plegadas espontáneamente de las proteínas recombinantes PrP₂₃₋₂₃₁, PrP_{Δ51-90} y PrP_{Δ90} en sustratos que contenían las mismas PrPs complementados con dextrano sulfatado. Todas las semillas al propagarse en este nuevo entorno acaban con un patrón de migración electroforética uniforme, lo que sugiere que el dextrano

sulfatado podría favorecer la propagación de una única variante conformacional predominante la cual estaría presente como especie minoritaria en las semillas originales con lo que el patrón asociado a esa variante no sería visible en un entorno de encéfalo de *Prnp^{0/0}*. Algo similar se observó en un estudio de Ellet y colaboradores, en el que utilizaron glicosaminoglicanos sulfatados los cuales determinan un mal plegamiento específico de la proteína, dando lugar a unas características bioquímicas diferentes a la que se obtiene de la misma proteína en ausencia de estos cofactores (Ellett et al., 2015). Aunque los resultados anteriores secundan la idea de que la carga de los cofactores utilizados puede afectar al tipo de mal plegamiento de la proteína, nuestro trabajo apoyaría la selección de una variante estructural determinada en presencia de dextrano sulfatado, mientras que en un entorno encefálico podría encontrarse de forma minoritaria. Aparte del cambio de patrón electroforético, pudimos observar que las variantes $\Delta 90$ una vez propagadas en dextrano sulfatado presentaban infectividad *in vitro*. En el caso particular de las proteínas mal plegadas $\Delta 51-90$, la similitud de los patrones de migración electroforéticos en contraste con sus distintas infectividades *in vitro*, sugieren que o bien no son variantes conformacionales idénticas a pesar de su apariencia, o bien que en el caso del inóculo 2 (infecciosa en encéfalo *Prnp^{0/0}*) se propaga en dextrano mayoritariamente una variante no infectiva, que es la única detectable en Coomassie por cuestión de cantidad, pero sin haberse impedido por completo la propagación de la variante infecciosa. En cuanto a las semillas 1 y 3, que ninguna variante con capacidad infectiva hubiese emergido tras su propagación en dextrano podría deberse a la ausencia de dicha variante en la semilla original, cuya mezcla de variantes conformacionales podría ser sustancialmente distinta. Todo esto parece indicar que las variantes que muestran infectividad *in vitro* podrían haber estado presentes en cantidades minoritarias en las semillas originales, indetectables hasta su selección mediante propagación en dextrano sulfatado. Y a su vez, que las que no fueron capaces de presentar infectividad *in vitro* después de ser propagadas en sustratos complementados con dextrano sulfatado no contendrían desde un principio (en la semilla original) ninguna conformación infecciosa y por tanto, sería imposible seleccionarlas. Tras observar que las proteínas mal plegadas que mostraban infectividad perdían esta característica cuando eran propagadas a expensas de proteínas carentes de la región polibásica y que de las 9 proteínas mal plegadas espontáneamente (de las que únicamente la $\text{PrP}_{\Delta 51-90}$ (2) mostraba infectividad), la gran mayoría resultaron infecciosas cuando eran propagadas en un entorno de dextrano sulfatado; se decidió propagar las semillas $\text{PrP}_{\Delta 51-90}$ (2) y (3) propagadas a expensas de las proteínas carentes de la región polibásica a un entorno de dextrano sulfatado. Así, se pretendía favorecer mediante la complementación con dextrano, la propagación de cualquier variante conformacional infecciosa que aun de forma minoritaria podría haber propagado a pesar de la ausencia de la región polibásica. De forma similar a las 9 proteínas mal plegadas generadas de forma espontánea, los patrones de movilidad electroforética se uniformizaron pudiendo suponerse de nuevo que una variante conformacional específica había sido seleccionada entre las existentes. Aun así, a pesar de haberse seleccionado una variante determinada en un entorno de dextrano sulfatado, ninguna de las proteínas mal plegadas carentes de región polibásica sostuvo la propagación de una variante con infectividad *in vitro*. Además, sorprendentemente la proteína carente de los aminoácidos 23-31 fue incapaz de mal

plegarse y perpetuarse en un entorno de dextrano, con lo que conlleva a pensar que las variantes conformacionales existentes en esta semilla no soportarían la selección ejercida por el dextrano.

El mecanismo preciso por el cual los cofactores mejoran o dirigen el mal plegamiento *in vitro* sigue sin estar claro. Podrían actuar uniéndose a la PrP^C alterando así la conformación nativa e incrementando el contenido de β -láminas y agregando por tanto la PrP, o podrían facilitar la conversión de PrP concentrando PrP^{Sc} y PrP^C en la superficie de vesículas lipídicas o moléculas polianiónicas, o tal vez estabilizando la conformación de la PrP^{Sc} (Ma, 2012). El concepto de que los cofactores pueden desempeñar un papel clave en la selección conformacional de priones tiene varias implicaciones para comprender la patogénesis de las enfermedades priónicas y su capacidad de propagarse en diferentes tejidos y huéspedes (Fehlinger et al., 2017; Fernández-Borges, Di Bari, et al., 2017).

En conclusión, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en esta tesis doctoral podría decirse que la región polibásica actuaría como una región selectora que restringiría la propagación de determinadas variantes conformacionales presentes en una semilla, favoreciendo la propagación de ciertas variantes frente a otras, y que la ausencia de la región N-terminal no determina la infectividad de una cepa *per se*. Por ello, podríamos concluir que nuestras proteínas mal plegadas generadas espontáneamente están sometidas a una doble selección cuando se propagan a expensas de diferentes sustratos: una efectuada por la región polibásica de la proteína y la segunda selección llevada a cabo por el dextrano sulfatado, que favorecería la propagación de conformaciones infecciosas, siempre que se encuentren en la semilla original (Figura 1). Por ello, pensando que sería de un gran interés poder estudiar el papel de la región N-terminal en modelos *in vivo*, se han generado dos líneas de ratones transgénicos que expresan entre 1 y 2 veces la PrP _{Δ 51-90} respecto a la PrP de ratón salvaje. Estas líneas transgénicas ayudarán a esclarecer el papel de esta región sobre todo en la neurotoxicidad priónica.

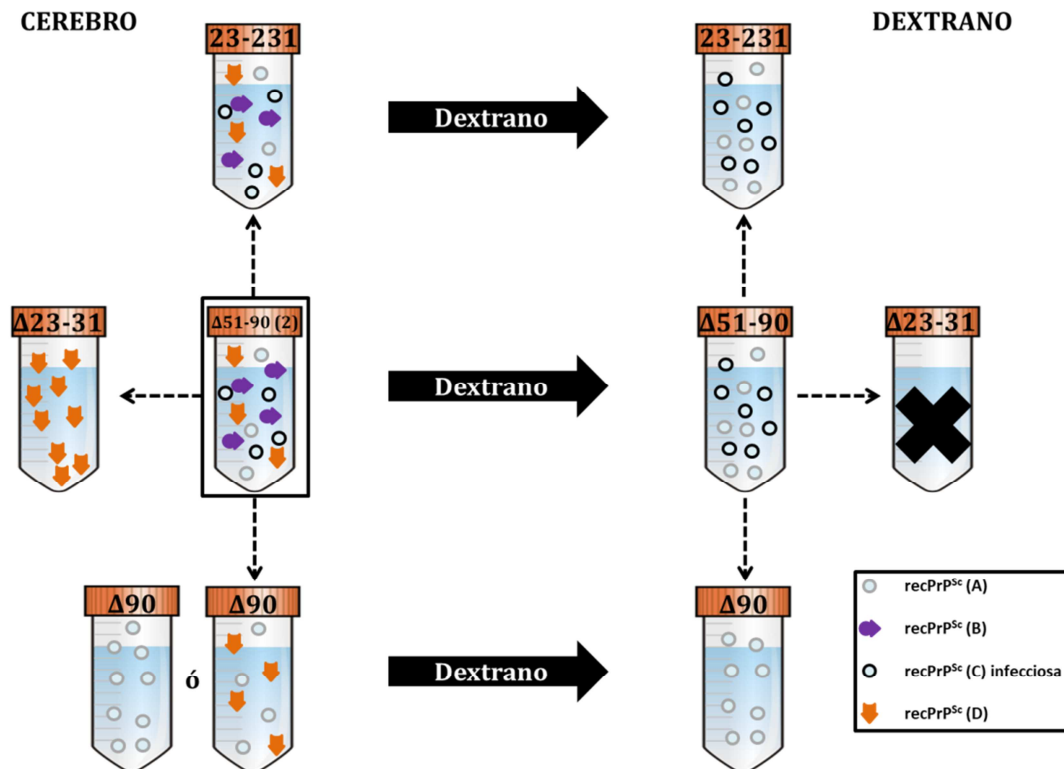


Figura 1. Modelo de la generación y selección de las proteínas recombinantes mal plegadas. Dibujo animado que muestra la generación de 4 diferentes variantes conformacionales a partir de la misma secuencia aminoacídica (figuras moradas, naranjas, negras y blancas) después de rondas de recPMCA sin semilla. Se obtienen diferentes proporciones de variantes conformacionales como consecuencia de la presencia de los componentes del homogeneizado cerebral. Se observa una selección de variantes dependiente de la proteína en la que esté basado el sustrato donde se propaga (izquierda) y una selección dependiente de la presencia del dextrano sulfatado como único cofactor (derecha). La PMCA seriada selecciona positivamente la variante recombinante priónica que se favorece a expensas del resto de las variantes y que incluso podrían a desaparecer.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Las proteínas recombinantes PrP murinas delecionadas en la región N-terminal poseen mayor capacidad de mal plegamiento inducidas por semilla que espontáneamente.
2. Las deleciones en la región polibásica de la proteína priónica interfiere en el mal plegamiento espontáneo.
3. Las proteínas recombinantes PrP murinas delecionadas en la región C-terminal no muestran capacidad de mal plegamiento por ninguna de las vías utilizadas.
4. Las semillas generadas de forma espontánea revelan diferencias en sus patrones electroforéticos de migración a pesar de ser las misma secuencias aminoacídicas.
5. Ninguna de las proteínas mal plegadas generadas espontáneamente se diferencian a través de métodos bioquímicos característicos de los priones.
6. Solo una de las variantes de la proteína mal plegada portadora de la deleción en la región de las octarepeticiones ($\Delta 51-90$) posee capacidad infectiva *in vitro*.
7. El extremo N-terminal, en concreto la región polibásica, posee una influencia significativa en el mantenimiento de las propiedades biológicas de las semillas.
8. El dextrano sulfatado utilizado como complemento en los sustratos permite la propagación de manera preferencial de una variante en particular de la mezcla de variantes existentes en la semilla inicial.

BIBLIOGRAFÍA

- Abalos, G. C., Cruite, J. T., Bellon, A., Hemmers, S., Akagi, J., Mastrianni, J. A., . . . Solforosi, L. (2008). Identifying Key Components of the PrP(C)-PrP(Sc) Replicative Interface. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(49), 34021-34028. doi: 10.1074/jbc.M804475200
- Abid, K., Morales, R., & Soto, C. (2010). CELLULAR FACTORS IMPLICATED IN PRION REPLICATION. *FEBS Letters*, 584(11), 2409-2414. doi: 10.1016/j.febslet.2010.04.040
- Abid, K., & Soto, C. (2006). The intriguing prion disorders. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 63(19-20), 2342-2351. doi: 10.1007/s00018-006-6140-5
- Adler, V., Zeiler, B., Kryukov, V., Kascsak, R., Rubenstein, R., & Grossman, A. (2003). Small, Highly Structured RNAs Participate in the Conversion of Human Recombinant PrP^{Sc} to PrP^{Res} in Vitro. *Journal of Molecular Biology*, 332(1), 47-57.
- Agrimi, U., Nonno, R., Dell'Omo, G., Di Bari, M. A., Conte, M., Chiappini, B., . . . Lipp, H.-P. (2008). Prion Protein Amino Acid Determinants of Differential Susceptibility and Molecular Feature of Prion Strains in Mice and Voles. *PLOS Pathogens*, 4(7), e1000113. doi: 10.1371/journal.ppat.1000113
- Aguilar-Calvo, P., Xiao, X., Bett, C., Eraña, H., Soldau, K., Castilla, J., . . . Sigurdson, C. J. (2017). Post-translational modifications in PrP expand the conformational diversity of prions in vivo. *Scientific Reports*, 7, 43295. doi: 10.1038/srep43295
- Aguzzi, A. (2005). Cell biology. Prion toxicity: all sail and no anchor. *Science*, 308(5727), 1420-1421. doi: 10.1126/science.1114168
- Aguzzi, A., Baumann, F., & Bremer, J. (2008). The prion's elusive reason for being. *Annu Rev Neurosci*, 31, 439-477. doi: 10.1146/annurev.neuro.31.060407.125620
- Aguzzi, A., & Calella, A. M. (2009). Prions: Protein Aggregation and Infectious Diseases. *Physiological Reviews*, 89(4), 1105-1152. doi: 10.1152/physrev.00006.2009
- Aguzzi, A., & Falsig, J. (2012). Prion propagation, toxicity and degradation. *Nat Neurosci*, 15(7), 936-939. doi: 10.1038/nn.3120
- Aguzzi, A., Heikenwalder, M., & Polymenidou, M. (2007). Insights into prion strains and neurotoxicity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(7), 552-561. doi: 10.1038/nrm2204
- Aguzzi, A., Montrasio, F., & Kaeser, P. S. (2001). Prions: health scare and biological challenge. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(2), 118-126. doi: 10.1038/35052063
- Aguzzi, A., Montrasio, F., & Kaeser, P. S. (2001). Prions: health scare and biological challenge. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(2), 118-126.
- Aguzzi, A., Sigurdson, C., & Heikenwaelder, M. (2008). Molecular mechanisms of prion pathogenesis. *Annu Rev Pathol*, 3, 11-40. doi: 10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.154326
- Alper, T., Cramp, W. A., Haig, D. A., & Clarke, M. C. (1967). Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature*, 214(5090), 764-766.

- Anderson, R. M., Donnelly, C. A., Ferguson, N. M., Woolhouse, M. E., Watt, C. J., Udy, H. J., . . . Wells, G. A. (1996). Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature*, 382(6594), 779-788. doi: 10.1038/382779a0
- Andréoletti, O., Berthon, P., Marc, D., Sarradin, P., Grosclaude, J., van Keulen, L., . . . Lantier, F. (2000). Early accumulation of PrP^{Sc} in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *Journal of General Virology*, 81(12), 3115-3126. doi: doi:10.1099/0022-1317-81-12-3115
- Andréoletti, O., Lacroux, C., Chabert, A., Monnereau, L., Tabouret, G., Lantier, F., . . . Schelcher, F. (2002). PrP^{Sc} accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission. *Journal of General Virology*, 83(10), 2607-2616. doi: doi:10.1099/0022-1317-83-10-2607
- Apetri, A. C., Surewicz, K., & Surewicz, W. K. (2004). The Effect of Disease-associated Mutations on the Folding Pathway of Human Prion Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 279(17), 18008-18014. doi: 10.1074/jbc.M313581200
- Asante, E. A., Gowland, I., Grimshaw, A., Linehan, J. M., Smidak, M., Houghton, R., . . . Collinge, J. (2009). Absence of spontaneous disease and comparative prion susceptibility of transgenic mice expressing mutant human prion proteins. *J Gen Virol*, 90(Pt 3), 546-558. doi: 10.1099/vir.0.007930-0
- Asante, E. A., Linehan, J. M., Desbruslais, M., Joiner, S., Gowland, I., Wood, A. L., . . . Collinge, J. (2002). BSE prions propagate as either variant CJD-like or sporadic CJD-like prion strains in transgenic mice expressing human prion protein. *The EMBO Journal*, 21(23), 6358-6366. doi: 10.1093/emboj/cdf653
- Asante, E. A., Linehan, J. M., Smidak, M., Tomlinson, A., Grimshaw, A., Jeelani, A., . . . Collinge, J. (2013). Inherited Prion Disease A117V Is Not Simply a Proteinopathy but Produces Prions Transmissible to Transgenic Mice Expressing Homologous Prion Protein. *PLOS Pathogens*, 9(9), e1003643. doi: 10.1371/journal.ppat.1003643
- Atarashi, R., Sano, K., Satoh, K., & Nishida, N. (2011). Real-time quaking-induced conversion: A highly sensitive assay for prion detection. *Prion*, 5(3), 150-153. doi: 10.4161/pri.5.3.16893
- Atarashi, R., Satoh, K., Sano, K., Fuse, T., Yamaguchi, N., Ishibashi, D., . . . Nishida, N. (2011). Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. *Nat Med*, 17(2), 175-178.
- Atarashi, R., Wilham, J. M., Christensen, L., Hughson, A. G., Moore, R. A., Johnson, L. M., . . . Caughey, B. (2008). Simplified ultrasensitive prion detection by recombinant PrP conversion with shaking. *Nat Meth*, 5(3), 211-212.

- Balkema-Buschmann, A., Fast, C., Kaatz, M., Eiden, M., Ziegler, U., McIntyre, L., . . . Groschup, M. H. (2011). Pathogenesis of classical and atypical BSE in cattle. *Prev Vet Med*, *102*(2), 112-117.
- Ballerini, C., Gourdain, P., Bachy, V., Blanchard, N., Levavasseur, E., Grégoire, S., . . . Carnaud, C. (2006). Functional Implication of Cellular Prion Protein in Antigen-Driven Interactions between T Cells and Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, *176*(12), 7254-7262. doi: 10.4049/jimmunol.176.12.7254
- Baron, G. S., & Caughey, B. (2003). Effect of Glycosylphosphatidylinositol Anchor-dependent and -independent Prion Protein Association with Model Raft Membranes on Conversion to the Protease-resistant Isoform. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(17), 14883-14892. doi: 10.1074/jbc.M210840200
- Barrenetxea, G. (2012). Iatrogenic prion diseases in humans: an update. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, *165*(2), 165-169. doi: 10.1016/j.ejogrb.2012.08.014
- Barria, M. A., Mukherjee, A., Gonzalez-Romero, D., Morales, R., & Soto, C. (2009). De Novo Generation of Infectious Prions In Vitro Produces a New Disease Phenotype. *PLOS Pathogens*, *5*(5), e1000421. doi: 10.1371/journal.ppat.1000421
- Bartz, J. C., Bessen, R. A., McKenzie, D., Marsh, R. F., & Aiken, J. M. (2000). Adaptation and selection of prion protein strain conformations following interspecies transmission of transmissible mink encephalopathy. *J Virol*, *74*(12), 5542-5547.
- Baskakov, I. V. (2007). Branched chain mechanism of polymerization and ultrastructure of prion protein amyloid fibrils. *FEBS Journal*, *274*(15), 3756-3765. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.05916.x
- Baskakov, I. V., Aagaard, C., Mehlhorn, I., Wille, H., Groth, D., Baldwin, M. A., . . . Cohen, F. E. (2000). Self-Assembly of Recombinant Prion Protein of 106 Residues. *Biochemistry*, *39*(10), 2792-2804. doi: 10.1021/bi9923353
- Baskakov, I. V., Legname, G., Baldwin, M. A., Prusiner, S. B., & Cohen, F. E. (2002). Pathway Complexity of Prion Protein Assembly into Amyloid. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(24), 21140-21148. doi: 10.1074/jbc.M111402200
- Baskakov, I. V., Legname, G., Prusiner, S. B., & Cohen, F. E. (2001). Folding of Prion Protein to Its Native α -Helical Conformation Is under Kinetic Control. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(23), 19687-19690. doi: 10.1074/jbc.C100180200
- Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Walchli, M., Groth, D. F., . . . Weissmann, C. (1986). Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell*, *46*(3), 417-428. doi: 0092-8674(86)90662-8 [pii]

- Baumann, F., Pahnke, J., Radovanovic, I., Rulicke, T., Bremer, J., Tolnay, M., & Aguzzi, A. (2009). Functionally relevant domains of the prion protein identified in vivo. *PLoS One*, 4(9), e6707. doi: 10.1371/journal.pone.0006707
- Baumann, F., Tolnay, M., Brabeck, C., Pahnke, J., Kloz, U., Niemann, H. H., . . . Aguzzi, A. (2007). Lethal recessive myelin toxicity of prion protein lacking its central domain. *EMBO J*, 26(2), 538-547. doi: 10.1038/sj.emboj.7601510
- Beck E, D. P. (1987). Neuropathology of transmissible Spongiform Encephalopathies. *See Prusiner & McKinley*, pp. 331-385.
- Beekes, M., McBride, P. A., & Baldauf, E. (1998). Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie. *Journal of General Virology*, 79(3), 601-607. doi: doi:10.1099/0022-1317-79-3-601
- Benestad, S. L., Austbø, L., Tranulis, M. A., Espenes, A., & Olsaker, I. (2012). Healthy goats naturally devoid of prion protein. *Vet Res*, 43(1), 87-87. doi: 10.1186/1297-9716-43-87
- Benestad, S. L., Mitchell, G., Simmons, M., Ytrehus, B., & Vikøren, T. (2016). First case of chronic wasting disease in Europe in a Norwegian free-ranging reindeer. *Vet Res*, 47, 88. doi: 10.1186/s13567-016-0375-4
- Benetti, F., & Legname, G. (2009). De novo mammalian prion synthesis. *Prion*, 3(4), 213-219. doi: 10.4161/pri.3.4.10181
- Béringue, V., Bencsik, A., Le Dur, A., Reine, F., Lai, T. L., Chenais, N., . . . Laude, H. (2006). Isolation from Cattle of a Prion Strain Distinct from That Causing Bovine Spongiform Encephalopathy. *PLOS Pathogens*, 2(10), e112. doi: 10.1371/journal.ppat.0020112
- Beringue, V., Demoy, M., Lasmézas, C. I., Gouritin, B., Weingarten, C., Deslys, J.-P., . . . Dormont, D. (2000). Role of spleen macrophages in the clearance of scrapie agent early in pathogenesis. *J Pathol*, 190(4), 495-502. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(200003)190:4<495::AID-PATH535>3.0.CO;2-T
- Berrow, N. S., Alderton, D., Sainsbury, S., Nettleship, J., Assenberg, R., Rahman, N., . . . Owens, R. J. (2007). A versatile ligation-independent cloning method suitable for high-throughput expression screening applications. *Nucleic Acids Res*, 35(6), e45. doi: 10.1093/nar/gkm047
- Bessen, R. A., & Marsh, R. F. (1992a). Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent. *J Virol*, 66(4), 2096-2101.
- Bessen, R. A., & Marsh, R. F. (1992b). Identification of two biologically distinct strains of transmissible mink encephalopathy in hamsters. *J Gen Virol*, 73 (Pt 2), 329-334. doi: 10.1099/0022-1317-73-2-329
- Bessen, R. A., & Marsh, R. F. (1994). Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J Virol*, 68(12), 7859-7868.

- Bett, C., Fernández-Borges, N., Kurt, T. D., Lucero, M., Nilsson, K. P. R., Castilla, J., & Sigurdson, C. J. (2012). Structure of the $\beta 2$ - $\alpha 2$ loop and interspecies prion transmission. *The FASEB Journal*, 26(7), 2868-2876. doi: 10.1096/fj.11-200923
- Bett, C., Joshi-Barr, S., Lucero, M., Trejo, M., Liberski, P., Kelly, J. W., . . . Sigurdson, C. J. (2012). Biochemical Properties of Highly Neuroinvasive Prion Strains. *PLOS Pathogens*, 8(2), e1002522. doi: 10.1371/journal.ppat.1002522
- Biacabe, A.-G., Laplanche, J.-L., Ryder, S., & Baron, T. (2004). Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO reports*, 5(1), 110-115. doi: 10.1038/sj.embor.7400054
- Biasini, E., Turnbaugh, J., Unterberger, U., & Harris, D. A. (2012). PRION PROTEIN AT THE CROSSROADS OF PHYSIOLOGY AND DISEASE. *Trends in Neurosciences*, 35(2), 92-103. doi: 10.1016/j.tins.2011.10.002
- Boellaard, J. W., & Schlote, W. (1980). [Subacute spongiform encephalopathy with multiform plaque formation. "Peculiar familial-hereditary disease of CNS [spinocerebellar atrophy with dementia, plaques, and plaque-like deposits in cerebellum and cerebrum" (Gerstmann, Strausler, Scheinker)] [author's transl]]. *Acta Neuropathol*, 49(3), 205-212.
- Bolton, D. C., McKinley, M. P., & Prusiner, S. B. (1982). Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science*, 218(4579), 1309-1311.
- Bonetto, V., Massignan, T., Chiesa, R., Morbin, M., Mazzoleni, G., Diomede, L., . . . Salmona, M. (2002). Synthetic Miniprion PrP106. *Journal of Biological Chemistry*, 277(35), 31327-31334. doi: 10.1074/jbc.M203275200
- Borchelt, D. R., Scott, M., Taraboulos, A., Stahl, N., & Prusiner, S. B. (1990). Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J Cell Biol*, 110(3), 743-752.
- Bradley, R., Collee, J. G., & Liberski, P. P. (2006). Review article
Variant CJD (vCJD) and Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE): 10 and 20 years on: part 1. *Folia Neuropathol*, 44(2), 93-101.
- Bradley, R., & Wilesmith, J. W. (1993). Epidemiology and control of bovine spongiform encephalopathy (BSE). *British Medical Bulletin*, 49(4), 932-959. doi: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a072654
- Brandner, S., Isenmann, S., Raeber, A., Fischer, M., Sailer, A., Kobayashi, Y., . . . Aguzzi, A. (1996). Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature*, 379(6563), 339-343.
- Brandner, S., Raeber, A., Sailer, A., Blattler, T., Fischer, M., Weissmann, C., & Aguzzi, A. (1996). Normal host prion protein (PrPC) is required for scrapie spread within the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(23), 13148-13151.

- Bremer, J., Baumann, F., Tiberi, C., Wessig, C., Fischer, H., Schwarz, P., . . . Aguzzi, A. (2010). Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance. *Nat Neurosci*, *13*(3), 310-318. doi: 10.1038/nn.2483
- Brown, D. R., Clive, C., & Haswell, S. J. (2001). Antioxidant activity related to copper binding of native prion protein. *Journal of Neurochemistry*, *76*(1), 69-76. doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00009.x
- Brown, D. R., Herms, J., & Kretzschmar, H. A. (1994). Mouse cortical cells lacking cellular PrP survive in culture with a neurotoxic PrP fragment. *Neuroreport*, *5*(16), 2057-2060.
- Brown, D. R., Nicholas, R. S. J., & Canevari, L. (2002). Lack of prion protein expression results in a neuronal phenotype sensitive to stress. *Journal of Neuroscience Research*, *67*(2), 211-224. doi: 10.1002/jnr.10118
- Brown, D. R., Qin, K., Herms, J. W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., . . . Kretzschmar, H. (1997). The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature*, *390*(6661), 684-687.
- Brown, H. R., Goller, N. L., Rudelli, R. D., Merz, G. S., Wolfe, G. C., Wisniewski, H. M., & Robakis, N. K. (1990). The mRNA encoding the scrapie agent protein is present in a variety of non-neuronal cells. *Acta Neuropathologica*, *80*(1), 1-6. doi: 10.1007/bf00294214
- Brown, P., Gibbs, C. J., Jr., Rodgers-Johnson, P., Asher, D. M., Sulima, M. P., Bacote, A., . . . Gajdusek, D. C. (1994). Human spongiform encephalopathy: the National Institutes of Health series of 300 cases of experimentally transmitted disease. *Ann Neurol*, *35*(5), 513-529. doi: 10.1002/ana.410350504
- Browning, S. R., Mason, G. L., Seward, T., Green, M., Eliason, G. A. J., Mathiason, C., . . . Telling, G. C. (2004). Transmission of Prions from Mule Deer and Elk with Chronic Wasting Disease to Transgenic Mice Expressing Cervid PrP. *Journal of Virology*, *78*(23), 13345-13350. doi: 10.1128/JVI.78.23.13345-13350.2004
- Bruce, M., Chree, A., McConnell, I., Foster, J., Pearson, G., & Fraser, H. (1994). Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice: strain variation and the species barrier. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *343*(1306), 405-411. doi: 10.1098/rstb.1994.0036
- Bruce, M. E. (2003). TSE strain variation. *Br Med Bull*, *66*, 99-108.
- Bruce, M. E., McConnell, I., Fraser, H., & Dickinson, A. G. (1991). The disease characteristics of different strains of scrapie in Sinc congenic mouse lines: implications for the nature of the agent and host control of pathogenesis. *J Gen Virol*, *72* (Pt 3), 595-603.
- Budka, H., Aguzzi, A., Brown, P., Brucher, J. M., Bugiani, O., Collinge, J., . . . Hauw, J. J. (1995). Tissue handling in suspected Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and other human spongiform encephalopathies (prion diseases). *Brain Pathol*, *5*(3), 319-322.

- Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguet, M., & Weissmann, C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*, *73*(7), 1339-1347. doi: 0092-8674(93)90360-3 [pii]
- Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H. P., DeArmond, S. J., . . . Weissmann, C. (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature*, *356*(6370), 577-582. doi: 10.1038/356577a0
- Bueler, H., Raeber, A., Sailer, A., Fischer, M., Aguzzi, A., & Weissmann, C. (1994). High prion and PrPSc levels but delayed onset of disease in scrapie-inoculated mice heterozygous for a disrupted PrP gene. *Mol Med*, *1*(1), 19-30.
- Byron Caughey and Peter T. Lansbury. (2003). Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci*, *26*, 267-298.
- Carlson, G. A., Ebeling, C., Yang, S. L., Telling, G., Torchia, M., Groth, D., . . . Prusiner, S. B. (1994). Prion isolate specified allotypic interactions between the cellular and scrapie prion proteins in congenic and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*(12), 5690-5694.
- Carlson, G. A., Goodman, P. A., Lovett, M., Taylor, B. A., Marshall, S. T., Peterson-Torchia, M., . . . Prusiner, S. B. (1988). Genetics and polymorphism of the mouse prion gene complex: control of scrapie incubation time. *Molecular and Cellular Biology*, *8*(12), 5528-5540.
- Casalone, C., Zanusso, G., Acutis, P., Ferrari, S., Capucci, L., Tagliavini, F., . . . Caramelli, M. (2004). Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: Molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(9), 3065-3070. doi: 10.1073/pnas.0305777101
- Cashman, N. R., Loertscher, R., Nalbantoglu, J., Shaw, I., Kascsak, R. J., Bolton, D. C., & Bendheim, P. E. (1990). Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell*, *61*(1), 185-192. doi: 10.1016/0092-8674(90)90225-4
- Castilla, J., Gonzalez-Romero, D., Saa, P., Morales, R., De Castro, J., & Soto, C. (2008). Crossing the species barrier by PrP(Sc) replication in vitro generates unique infectious prions. *Cell*, *134*(5), 757-768. doi: S0092-8674(08)00950-1 [pii]10.1016/j.cell.2008.07.030
- Castilla, J., Gutierrez-Adan, A., Brun, A., Doyle, D., Pintado, B., Ramirez, M. A., . . . Torres, J. M. (2004). Subclinical bovine spongiform encephalopathy infection in transgenic mice expressing porcine prion protein. *J Neurosci*, *24*(21), 5063-5069. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5400-03.200424/21/5063 [pii]
- Castilla, J., Gutiérrez-Adán, A., Brun, A., Pintado, B., Parra, B., Ramírez, M. A., . . . Torres, J. M. (2004). Different Behavior toward Bovine Spongiform Encephalopathy Infection of Bovine Prion

- Protein Transgenic Mice with One Extra Repeat Octapeptide Insert Mutation. *The Journal of Neuroscience*, 24(9), 2156-2164. doi: 10.1523/jneurosci.3811-03.2004
- Castilla, J., Morales, R., Saa, P., Barria, M., Gambetti, P., & Soto, C. (2008). Cell-free propagation of prion strains. *EMBO J*, 27(19), 2557-2566. doi: emboj2008181 [pii]10.1038/emboj.2008.181
- Castilla, J., Saa, P., Hetz, C., & Soto, C. (2005). In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell*, 121(2), 195-206. doi: S0092-8674(05)00156-X [pii]10.1016/j.cell.2005.02.011
- Castilla, J., Saa, P., Morales, R., Abid, K., Maundrell, K., & Soto, C. (2006). Protein misfolding cyclic amplification for diagnosis and prion propagation studies. *Methods Enzymol*, 412, 3-21. doi: S0076-6879(06)12001-7 [pii]10.1016/S0076-6879(06)12001-7
- Castilla, J., Saa, P., & Soto, C. (2005). Detection of prions in blood. *Nat Med*, 11(9), 982-985. doi: nm1286 [pii]10.1038/nm1286
- Caughey, B., Baron, G. S., Chesebro, B., & Jeffrey, M. (2009). Getting a grip on prions: oligomers, amyloids and pathological membrane interactions. *Annual review of biochemistry*, 78, 177-204. doi: 10.1146/annurev.biochem.78.082907.145410
- Caughey, B., & Chesebro, B. (2001). Transmissible spongiform encephalopathies and prion protein interconversions. *Advances in Virus Research*, 56, 277-311.
- Caughey, B., Kocisko, D. A., Raymond, G. J., & Lansbury, P. T., Jr. (1995). Aggregates of scrapie-associated prion protein induce the cell-free conversion of protease-sensitive prion protein to the protease-resistant state. *Chem Biol*, 2(12), 807-817.
- Caughey, B., & Raymond, G. J. (1991). The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J Biol Chem*, 266(27), 18217-18223.
- Caughey, B., & Raymond, G. J. (1993). Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells. *Journal of Virology*, 67(2), 643-650.
- Cobb, N. J., Sönnichsen, F. D., McHaourab, H., & Surewicz, W. K. (2007). Molecular architecture of human prion protein amyloid: A parallel, in-register β -structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(48), 18946-18951. doi: 10.1073/pnas.0706522104
- Cobb, N. J., & Surewicz, W. K. (2009). Prion diseases and their biochemical mechanisms. *Biochemistry*, 48(12), 2574-2585. doi: 10.1021/bi900108v
- Cochius, J. I., Hyman, N., & Esiri, M. M. (1992). Creutzfeldt-Jakob disease in a recipient of human pituitary-derived gonadotrophin: a second case. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 55(11), 1094-1095. doi: 10.1136/jnnp.55.11.1094

- Cohen, F. E., & Prusiner, S. B. (1998). Pathologic conformations of prion proteins. *Annu Rev Biochem*, 67, 793-819. doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.793
- Colby, D. W., Giles, K., Legname, G., Wille, H., Baskakov, I. V., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (2009). Design and construction of diverse mammalian prion strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(48), 20417-20422. doi: 10.1073/pnas.0910350106
- Colby, D. W., Wain, R., Baskakov, I. V., Legname, G., Palmer, C. G., Nguyen, H.-O. B., . . . Prusiner, S. B. (2010). Protease-Sensitive Synthetic Prions. *PLOS Pathogens*, 6(1), e1000736. doi: 10.1371/journal.ppat.1000736
- Collee, J. G., Bradley, R., & Liberski, P. P. (2006). Review article
Variant CJD (vCJD) and Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE): 10 and 20 years on: part 2. *Folia Neuropathol*, 44(2), 102-110.
- Collinge, J. (1999). Variant Creutzfeldt-Jakob disease. *The Lancet*, 354(9175), 317-323. doi: 10.1016/S0140-6736(99)05128-4
- Collinge, J. (2001). Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci*, 24, 519-550.
- Collinge, J., & Clarke, A. R. (2007). A General Model of Prion Strains and Their Pathogenicity. *Science*, 318(5852), 930-936. doi: 10.1126/science.1138718
- Collinge, J., Palmer, M. S., & Dryden, A. J. (1991). Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*, 337(8755), 1441-1442. doi: 0140-6736(91)93128-V [pii]
- Collinge, J., Palmer, M. S., Sidle, K. C., Hill, A. F., Gowland, I., Meads, J., . . . Lantos, P. L. (1995). Unaltered susceptibility to BSE in transgenic mice expressing human prion protein. *Nature*, 378(6559), 779-783. doi: 10.1038/378779a0
- Collinge, J., Sidle, K. C., Meads, J., Ironside, J., & Hill, A. F. (1996). Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature*, 383(6602), 685-690. doi: 10.1038/383685a0
- Collinge, J., Whitfield, J., McKintosh, E., Beck, J., Mead, S., Thomas, D. J., & Alpers, M. P. (2006). Kuru in the 21st century—an acquired human prion disease with very long incubation periods. *The Lancet*, 367(9528), 2068-2074. doi: 10.1016/S0140-6736(06)68930-7
- Collinge, J., Whittington, M. A., Sidle, K. C. L., Smith, C. J., Palmer, M. S., Clarke, A. R., & Jefferys, J. G. R. (1994). Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature*, 370(6487), 295-297.
- Collins, S. J., Lawson, V. A., & Masters, C. L. (2004). Transmissible spongiform encephalopathies. *Lancet*, 363(9402), 51-61. doi: 10.1016/S0140-6736(03)15171-9
- Cordeiro, Y., Machado, F., Juliano, L., Juliano, M. A., Brentani, R. R., Foguel, D., & Silva, J. L. (2001). DNA Converts Cellular Prion Protein into the β -Sheet Conformation and Inhibits Prion

- Peptide Aggregation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(52), 49400-49409. doi: 10.1074/jbc.M106707200
- Cotto, E., André, M., Forgue, J., Fleury, H. J., & Babin, P. J. (2005). Molecular characterization, phylogenetic relationships, and developmental expression patterns of prion genes in zebrafish (*Danio rerio*). *FEBS Journal*, 272(2), 500-513. doi: 10.1111/j.1742-4658.2004.04492.x
- Creutzfeldt, H. G. (1920). Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z Gesamte Neurol Psychiatr*, 57, 1-19.
- Criado, J. R., Sánchez-Alavez, M., Conti, B., Giacchino, J. L., Wills, D. N., Henriksen, S. J., . . . Oldstone, M. B. A. (2005). Mice devoid of prion protein have cognitive deficits that are rescued by reconstitution of PrP in neurons. *Neurobiology of Disease*, 19(1-2), 255-265. doi: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2005.01.001>
- Cronier, S., Gros, N., Tattum, M H., Jackson, Graham S., Clarke, Anthony R., Collinge, J., & Wadsworth, Jonathan D F. (2008). Detection and characterization of proteinase K-sensitive disease-related prion protein with thermolysin. *Biochemical Journal*, 416(Pt 2), 297-305. doi: 10.1042/BJ20081235
- Cuille, J. a., & Chelle, P. L. (1936). La maladie dite [ldquo]treublante du mouton[rldquo] est-elle inoculable? *CR Acad Sci, Paris*, 203, 1552-1554.
- Cunningham, C., Deacon, R., Wells, H., Boche, D., Waters, S., Diniz, C. P., . . . Perry, V. H. (2003). Synaptic changes characterize early behavioural signs in the ME7 model of murine prion disease. *European Journal of Neuroscience*, 17(10), 2147-2155. doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.02662.x
- Cunningham, C., Wilcockson, D. C., Campion, S., Lunnon, K., & Perry, V. H. (2005). Central and Systemic Endotoxin Challenges Exacerbate the Local Inflammatory Response and Increase Neuronal Death during Chronic Neurodegeneration. *The Journal of Neuroscience*, 25(40), 9275-9284. doi: 10.1523/jneurosci.2614-05.2005
- Chandler, R. L. (1961). ENCEPHALOPATHY IN MICE PRODUCED BY INOCULATION WITH SCRAPIE BRAIN MATERIAL. *The Lancet*, 277(7191), 1378-1379. doi: 10.1016/S0140-6736(61)92008-6
- Chen, S., Mangé, A., Dong, L., Lehmann, S., & Schachner, M. (2003). Prion protein as trans-interacting partner for neurons is involved in neurite outgrowth and neuronal survival. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 22(2), 227-233.
- Chen, S. G., Teplow, D. B., Parchi, P., Teller, J. K., Gambetti, P., & Autilio-Gambetti, L. (1995). Truncated Forms of the Human Prion Protein in Normal Brain and in Prion Diseases. *Journal of Biological Chemistry*, 270(32), 19173-19180. doi: 10.1074/jbc.270.32.19173

- Chesebro, B., Race, B., Meade-White, K., LaCasse, R., Race, R., Klingeborn, M., . . . Jeffrey, M. (2010). Fatal Transmissible Amyloid Encephalopathy: A New Type of Prion Disease Associated with Lack of Prion Protein Membrane Anchoring. *PLoS Pathogens*, 6(3), e1000800. doi: 10.1371/journal.ppat.1000800
- Chesebro, B., Race, R., Wehrly, K., Nishio, J., Bloom, M., Lechner, D., . . . Haase, A. (1985). Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature*, 315(6017), 331-333.
- Chesebro, B., Trifilo, M., Race, R., Meade-White, K., Teng, C., LaCasse, R., . . . Oldstone, M. (2005). Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science*, 308(5727), 1435-1439. doi: 308/5727/1435 [pii]10.1126/science.1110837
- Chianini, F., Fernandez-Borges, N., Vidal, E., Gibbard, L., Pintado, B., de Castro, J., . . . Castilla, J. (2012). Rabbits are not resistant to prion infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(13), 5080-5085. doi: 1120076109 [pii]10.1073/pnas.1120076109
- Chiarini, L. B., Freitas, A. R. O., Zanata, S. M., Brentani, R. R., Martins, V. R., & Linden, R. (2002). Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *The EMBO Journal*, 21(13), 3317-3326. doi: 10.1093/emboj/cdf324
- Chiesa, R., Piccardo, P., Ghetti, B., & Harris, D. A. (1998). Neurological Illness in Transgenic Mice Expressing a Prion Protein with an Insertional Mutation. *Neuron*, 21(6), 1339-1351. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80653-4
- Choi, J.-K., Cali, I., Surewicz, K., Kong, Q., Gambetti, P., & Surewicz, W. K. (2016). Amyloid fibrils from the N-terminal prion protein fragment are infectious. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(48), 13851-13856. doi: 10.1073/pnas.1610716113
- D A Parsell, a., & Lindquist, S. (1993). The Function of Heat-Shock Proteins in Stress Tolerance: Degradation and Reactivation of Damaged Proteins. *Annual Review of Genetics*, 27(1), 437-496. doi: 10.1146/annurev.ge.27.120193.002253
- Das, N. R., Miyata, H., Hara, H., Uchiyama, K., Chida, J., Yano, M., . . . Sakaguchi, S. (2017). Effects of prion protein devoid of the N-terminal residues 25-50 on prion pathogenesis in mice. *Arch Virol*, 162(7), 1867-1876. doi: 10.1007/s00705-017-3295-3
- de Almeida, C. J. G., Chiarini, L. B., da Silva, J. P., e Silva, P. M. R., Martins, M. A., & Linden, R. (2005). The cellular prion protein modulates phagocytosis and inflammatory response. *J Leukoc Biol*, 77(2), 238-246. doi: 10.1189/jlb.1103531
- DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (1995). Prion protein transgenes and the neuropathology in prion diseases. *Brain Pathol*, 5(1), 77-89.

- DeBurman, S. K., Raymond, G. J., Caughey, B., & Lindquist, S. (1997). Chaperone-supervised conversion of prion protein to its protease-resistant form. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(25), 13938-13943.
- Deleault, N. R., Geoghegan, J. C., Nishina, K., Kascsak, R., Williamson, R. A., & Supattapone, S. (2005). Protease-resistant Prion Protein Amplification Reconstituted with Partially Purified Substrates and Synthetic Polyanions. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(29), 26873-26879. doi: 10.1074/jbc.M503973200
- Deleault, N. R., Harris, B. T., Rees, J. R., & Supattapone, S. (2007). Formation of native prions from minimal components in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(23), 9741-9746. doi: 0702662104 [pii]10.1073/pnas.0702662104
- Deleault, N. R., Kascsak, R., Geoghegan, J. C., & Supattapone, S. (2010). Species-Dependent Differences in Cofactor Utilization for Formation of the Protease-Resistant Prion Protein in Vitro. *Biochemistry*, *49*(18), 3928-3934. doi: 10.1021/bi100370b
- Deleault, N. R., Lucassen, R. W., & Supattapone, S. (2003). RNA molecules stimulate prion protein conversion. *Nature*, *425*(6959), 717-720.
- Deleault, N. R., Piro, J. R., Walsh, D. J., Wang, F., Ma, J., Geoghegan, J. C., & Supattapone, S. (2012). Isolation of phosphatidylethanolamine as a solitary cofactor for prion formation in the absence of nucleic acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(22), 8546-8551. doi: 10.1073/pnas.1204498109
- Deleault, N. R., Walsh, D. J., Piro, J. R., Wang, F., Wang, X., Ma, J., . . . Supattapone, S. (2012). Cofactor molecules maintain infectious conformation and restrict strain properties in purified prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(28), E1938-E1946. doi: 10.1073/pnas.1206999109
- DeMarco, M. L., & Daggett, V. (2004). From conversion to aggregation: Protofibril formation of the prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(8), 2293-2298. doi: 10.1073/pnas.0307178101
- Deriziotis, P., André, R., Smith, D. M., Goold, R., Kinghorn, K. J., Kristiansen, M., . . . Tabrizi, S. J. (2011). Misfolded PrP impairs the UPS by interaction with the 20S proteasome and inhibition of substrate entry. *The EMBO Journal*, *30*(15), 3065-3077. doi: 10.1038/emboj.2011.224
- Di Bari, M. A., Nonno, R., Castilla, J., D'Agostino, C., Pirisinu, L., Riccardi, G., . . . Agrimi, U. (2013). Chronic Wasting Disease in Bank Voles: Characterisation of the Shortest Incubation Time Model for Prion Diseases. *PLOS Pathogens*, *9*(3), e1003219. doi: 10.1371/journal.ppat.1003219
- Diaz-Espinoza, R., & Soto, C. (2012). High-resolution structure of infectious prion protein: the final frontier. *Nature structural & molecular biology*, *19*(4), 370-377. doi: 10.1038/nsmb.2266

- Dickinson, A. G. (1976). Scrapie in sheep and goats. *Front Biol*, 44, 209-241.
- Donnelly, C. A., Ferguson, N. M., Ghani, A. C., Woolhouse, M. E., Watt, C. J., & Anderson, R. M. (1997). The epidemiology of BSE in cattle herds in Great Britain. I. Epidemiological processes, demography of cattle and approaches to control by culling. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 352(1355), 781-801.
- Dossena, S., Imeri, L., Mangieri, M., Garofoli, A., Ferrari, L., Senatore, A., . . . Chiesa, R. (2008). Mutant prion protein expression causes motor and memory deficits and abnormal sleep patterns in a transgenic mouse model. *Neuron*, 60(4), 598-609. doi: S0896-6273(08)00755-1 [pii]10.1016/j.neuron.2008.09.008
- Duffy P , J. W., G Collins, AG DeVoe, B Streeten, D Cowen. (1974). Possible Person-to-Person Transmission of Creutzfeldt-Jakob Disease. *New England Journal of Medicine*, 290(12), 692-693. doi: 10.1056/nejm197403212901220
- Eanes, E. D., & Glenner, G. G. (1968). X-RAY DIFFRACTION STUDIES ON AMYLOID FILAMENTS. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 16(11), 673-677. doi: doi:10.1177/16.11.673
- Elezgarai, S. R., Fernández-Borges, N., Eraña, H., Sevillano, A. M., Charco, J. M., Harrathi, C., . . . Castilla, J. (2017). Generation of a new infectious recombinant prion: a model to understand Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome. *Scientific Reports*, 7, 9584. doi: 10.1038/s41598-017-09489-3
- Ellett, L. J., Coleman, B. M., Shambrook, M. C., Johanssen, V. A., Collins, S. J., Masters, C. L., . . . Lawson, V. A. (2015). Glycosaminoglycan sulfation determines the biochemical properties of prion protein aggregates. *Glycobiology*, 25(7), 745-755. doi: 10.1093/glycob/cwv014
- Eraña, H., Fernández-Borges, N., Elezgarai, S. R., Harrathi, C., Charco, J. M., Chianini, F., . . . Castilla, J. (2017). An in vitro approach to identify the key amino acids in the low susceptibility of rabbit PrP to misfolding. *Journal of Virology*. doi: 10.1128/jvi.01543-17
- Espinosa, J. C., Andréoletti, O., Castilla, J., Herva, M. E., Morales, M., Alamillo, E., . . . Torres, J. M. (2007). Sheep-Passaged Bovine Spongiform Encephalopathy Agent Exhibits Altered Pathobiological Properties in Bovine-PrP Transgenic Mice. *Journal of Virology*, 81(2), 835-843. doi: 10.1128/JVI.01356-06
- Evans, E. G. B., & Millhauser, G. L. (2017). Chapter Two - Copper- and Zinc-Promoted Interdomain Structure in the Prion Protein: A Mechanism for Autoinhibition of the Neurotoxic N-Terminus. In G. Legname & S. Vanni (Eds.), *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 150, pp. 35-56): Academic Press.
- Falsig, J., Sonati, T., Herrmann, U. S., Saban, D., Li, B., Arroyo, K., . . . Aguzzi, A. (2012). Prion Pathogenesis Is Faithfully Reproduced in Cerebellar Organotypic Slice Cultures. *PLoS Pathogens*, 8(11), e1002985. doi: 10.1371/journal.ppat.1002985

- Farquhar, C. F., & Dickinson, A. G. (1986). Prolongation of Scrapie Incubation Period by an Injection of Dextran Sulphate 500 within the Month Before or After Infection. *Journal of General Virology*, 67(3), 463-473. doi: doi:10.1099/0022-1317-67-3-463
- Fehlinger, A., Wolf, H., Hossinger, A., Duernberger, Y., Pleschka, C., Riemschoss, K., . . . Vorberg, I. M. (2017). Prion strains depend on different endocytic routes for productive infection. *Sci Rep*, 7(1), 6923. doi: 10.1038/s41598-017-07260-2
- Fernandez-Borges, N., de Castro, J., & Castilla, J. (2009). In vitro studies of the transmission barrier. *Prion*, 3(4), 220-223. doi: 10500 [pii]
- Fernández-Borges, N., Di Bari, M. A., Eraña, H., Sánchez-Martín, M., Pirisinu, L., Parra, B., . . . Castilla, J. (2017). Cofactors influence the biological properties of infectious recombinant prions. *Acta Neuropathologica*. doi: 10.1007/s00401-017-1782-y
- Fernández-Borges, N., Eraña, H., Elezgarai, S. R., Harrathi, C., Venegas, V., & Castilla, J. (2017). A Quick Method to Evaluate the Effect of the Amino Acid Sequence in the Misfolding Proneness of the Prion Protein. In V. A. Lawson (Ed.), *Prions: Methods and Protocols* (pp. 205-216). New York, NY: Springer New York.
- Fernández-Borges, N., Parra, B., Vidal, E., Eraña, H., Sánchez-Martín, M. A., de Castro, J., . . . Castilla, J. (2017). Unraveling the key to the resistance of canids to prion diseases. *PLOS Pathogens*, 13(11), e1006716. doi: 10.1371/journal.ppat.1006716
- Fevrier, B., Vilette, D., Archer, F., Loew, D., Faigle, W., Vidal, M., . . . Raposo, G. (2004). Cells release prions in association with exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(26), 9683-9688. doi: 10.1073/pnas.0308413101
- Fischer, M., Rulicke, T., Raeber, A., Sailer, A., Moser, M., Oesch, B., . . . Weissmann, C. (1996). Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J*, 15(6), 1255-1264.
- Flechsigs, E., Hegyi, I., Leimeroth, R., Zuniga, A., Rossi, D., Cozzio, A., . . . Weissmann, C. (2003). Expression of truncated PrP targeted to Purkinje cells of PrP knockout mice causes Purkinje cell death and ataxia. *EMBO J*, 22(12), 3095-3101. doi: 10.1093/emboj/cdg285
- Flechsigs, E., Shmerling, D., Hegyi, I., Raeber, A. J., Fischer, M., Cozzio, A., . . . Weissmann, C. (2000). Prion protein devoid of the octapeptide repeat region restores susceptibility to scrapie in PrP knockout mice. *Neuron*, 27(2), 399-408.
- Forloni, G., Angeretti, N., Chiesa, R., Monzani, E., Salmona, M., Bugiani, O., & Tagliavini, F. (1993). Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature*, 362(6420), 543-546.
- Fraser, H., & Bruce, M. (1973). Argyrophilic plaques in mice inoculated with scrapie from particular sources. *Lancet*, 1(7803), 617-618. doi: S0140-6736(73)90775-7 [pii]

- Friedman-Levi, Y., Meiner, Z., Canello, T., Frid, K., Kovacs, G. G., Budka, H., . . . Gabizon, R. (2011). Fatal Prion Disease in a Mouse Model of Genetic E200K Creutzfeldt-Jakob Disease. *PLoS Pathogens*, 7(11), e1002350. doi: 10.1371/journal.ppat.1002350
- Frost, B., & Diamond, M. I. (2010). Prion-like Mechanisms in Neurodegenerative Diseases. *Nature reviews. Neuroscience*, 11(3), 155-159. doi: 10.1038/nrn2786
- Gabizon, R., McKinley, M. P., & Prusiner, S. B. (1987). Purified prion proteins and scrapie infectivity copartition into liposomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(12), 4017-4021.
- Gabriel, J. M., Oesch, B., Kretzschmar, H., Scott, M., & Prusiner, S. B. (1992). Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(19), 9097-9101.
- Gajdusek, D. C. (1963). Kuru. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 57(3), 151-169. doi: 10.1016/0035-9203(63)90057-9
- Gajdusek, D. C., Gibbs, C. J., & Alpers, M. (1966). Experimental Transmission of a Kuru-like Syndrome to Chimpanzees. *Nature*, 209(5025), 794-796.
- Gambetti, P., Dong, Z., Yuan, J., Xiao, X., Zheng, M., Alshekhlee, A., . . . Zou, W. Q. (2008). A novel human disease with abnormal prion protein sensitive to protease. *Ann Neurol*, 63(6), 697-708. doi: 10.1002/ana.21420
- Gambetti, P., Kong, Q., Zou, W., Parchi, P., & Chen, S. G. (2003). Sporadic and familial CJD: classification and characterisation. *Br Med Bull*, 66, 213-239.
- Garza, M. C., Eraña, H., Castilla, J., Acín, C., Vargas, A., Badiola, J. J., & Monleón, E. (2017). Protein misfolding cyclic amplification corroborates the absence of PrPSc accumulation in placenta from foetuses with the ARR/ARQ genotype in natural scrapie. *Vet Microbiol*, 203, 294-300.
- Garza, M. C., Monzon, M., Marin, B., Badiola, J. J., & Monleon, E. (2014). Distribution of peripheral PrP(Sc) in sheep with naturally acquired scrapie. *PLoS One*, 9(5), e97768. doi: 10.1371/journal.pone.0097768
- Gavin, R., Braun, N., Nicolas, O., Parra, B., Urena, J. M., Mingorance, A., . . . del Rio, J. A. (2005). PrP(106-126) activates neuronal intracellular kinases and Egr1 synthesis through activation of NADPH-oxidase independently of PrPc. *FEBS Lett*, 579(19), 4099-4106. doi: 10.1016/j.febslet.2005.06.037
- Geoghegan, J. C., Valdes, P. A., Orem, N. R., Deleault, N. R., Williamson, R. A., Harris, B. T., & Supattapone, S. (2007). Selective Incorporation of Polyanionic Molecules into Hamster Prions. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(50), 36341-36353. doi: 10.1074/jbc.M704447200

- Gibbs, C. J., Gajdusek, D. C., Asher, D. M., Alpers, M. P., Beck, E., Daniel, P. M., & Matthews, W. B. (1968). Creutzfeldt-Jakob Disease (Spongiform Encephalopathy): Transmission to the Chimpanzee. *Science*, *161*(3839), 388-389. doi: 10.1126/science.161.3839.388
- Gielbert, A., Davis, L. A., Sayers, A. R., Hope, J., Gill, A. C., & Sauer, M. J. (2009). High-resolution differentiation of transmissible spongiform encephalopathy strains by quantitative N-terminal amino acid profiling (N-TAAP) of PK-digested abnormal prion protein. *Journal of Mass Spectrometry*, *44*(3), 384-396. doi: 10.1002/jms.1516
- Glatzel, M., & Aguzzi, A. (2000). PrP(C) expression in the peripheral nervous system is a determinant of prion neuroinvasion. *J Gen Virol*, *81*(Pt 11), 2813-2821. doi: 10.1099/0022-1317-81-11-2813
- Glatzel, M., & Aguzzi, A. (2001). The shifting biology of prions. *Brain Res Brain Res Rev*, *36*(2-3), 241-248.
- Gonzalez-Montalban, N., Makarava, N., Savtchenko, R., & Baskakov, I. V. (2011). Relationship between Conformational Stability and Amplification Efficiency of Prions. *Biochemistry*, *50*(37), 7933-7940. doi: 10.1021/bi200950v
- Gough, K. C., & Maddison, B. C. (2010). Prion transmission: Prion excretion and occurrence in the environment. *Prion*, *4*(4), 275-282. doi: 10.4161/pri.4.4.13678
- Gousset, K., Schiff, E., Langevin, C., Marijanovic, Z., Caputo, A., Browman, D. T., . . . Zurzolo, C. (2009). Prions hijack tunnelling nanotubes for intercellular spread. *Nat Cell Biol*, *11*(3), 328-336.
- Govaerts, C., Wille, H., Prusiner, S. B., & Cohen, F. E. (2004). Evidence for assembly of prions with left-handed β -helices into trimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(22), 8342-8347. doi: 10.1073/pnas.0402254101
- Grassmann, A., Wolf, H., Hofmann, J., Graham, J., & Vorberg, I. (2013). Cellular Aspects of Prion Replication In Vitro. *Viruses*, *5*(1), 374-405. doi: 10.3390/v5010374
- Green, K. M., Castilla, J., Seward, T. S., Napier, D. L., Jewell, J. E., Soto, C., & Telling, G. C. (2008). Accelerated High Fidelity Prion Amplification Within and Across Prion Species Barriers. *PLoS Pathogens*, *4*(8), e1000139. doi: 10.1371/journal.ppat.1000139
- Griffith, J. S. (1967). Self-replication and scrapie. *Nature*, *215*(5105), 1043-1044.
- Groveman, B. R., Dolan, M. A., Taubner, L. M., Kraus, A., Wickner, R. B., & Caughey, B. (2014). Parallel In-register Intermolecular β -Sheet Architectures for Prion-seeded Prion Protein (PrP) Amyloids. *The Journal of Biological Chemistry*, *289*(35), 24129-24142. doi: 10.1074/jbc.M114.578344
- Haass, C., & Selkoe, D. J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid [beta]-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *8*(2), 101-112.

- Hadlow, W. J. (1959). SCRAPIE AND KURU. *The Lancet*, 274(7097), 289-290. doi: 10.1016/S0140-6736(59)92081-1
- Hadlow, W. J., Kennedy, R. C., & Race, R. E. (1982). Natural Infection of Suffolk Sheep with Scrapie Virus. *The Journal of Infectious Diseases*, 146(5), 657-664. doi: 10.1093/infdis/146.5.657
- Haley, N. J., Mathiason, C. K., Carver, S., Zabel, M., Telling, G. C., & Hoover, E. A. (2011). Detection of Chronic Wasting Disease Prions in Salivary, Urinary, and Intestinal Tissues of Deer: Potential Mechanisms of Prion Shedding and Transmission. *Journal of Virology*, 85(13), 6309-6318. doi: 10.1128/JVI.00425-11
- Haley, N. J., Siepker, C., Hoon-Hanks, L. L., Mitchell, G., Walter, W. D., Manca, M., . . . Richt, J. A. (2016). Seeded Amplification of Chronic Wasting Disease Prions in Nasal Brushings and Recto-anal Mucosa-Associated Lymphoid Tissues from Elk by Real-Time Quaking-Induced Conversion. *J Clin Microbiol*, 54(4), 1117-1126. doi: 10.1128/JCM.02700-15
- Halliday, M., Radford, H., & Mallucci, G. R. (2014). Prions: Generation and Spread Versus Neurotoxicity. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(29), 19862-19868. doi: 10.1074/jbc.R114.568477
- Hara, H., Miyata, H., Das, N. R., Chida, J., Yoshimochi, T., Uchiyama, K., . . . Sakaguchi, S. (2017). Prion Protein Devoid of the Octapeptide Repeat Region Delays BSE Pathogenesis in Mice. *Journal of Virology*. doi: 10.1128/jvi.01368-17
- Harris, D. A., Huber, M. T., Van Dijken, P., Shyng, S. L., Chait, B. T., & Wang, R. (1993). Processing of a cellular prion protein: identification of N- and C-terminal cleavage sites. *Biochemistry*, 32(4), 1009-1016. doi: 10.1021/bi00055a003
- Haybaeck, J., Heikenwalder, M., Klevenz, B., Schwarz, P., Margalith, I., Bridel, C., . . . Aguzzi, A. (2011). Aerosols transmit prions to immunocompetent and immunodeficient mice. *PLoS Pathog*, 7(1), e1001257. doi: 10.1371/journal.ppat.1001257
- Hegde, R. S., Mastrianni, J. A., Scott, M. R., DeFea, K. A., Tremblay, P., Torchia, M., . . . Lingappa, V. R. (1998). A Transmembrane Form of the Prion Protein in Neurodegenerative Disease. *Science*, 279(5352), 827-834. doi: 10.1126/science.279.5352.827
- Heiseke A, A. Y., Schätzl HM. (2010). Autophagy, prion infection and their mutual interactions. *Curr Issues Mol Biol*, 12, 87-97.
- Henderson, D. M., Davenport, K. A., Haley, N. J., Denkers, N. D., Mathiason, C. K., & Hoover, E. A. (2015). Quantitative assessment of prion infectivity in tissues and body fluids by real-time quaking-induced conversion. *The Journal of General Virology*, 96(Pt 1), 210-219. doi: 10.1099/vir.0.069906-0
- Heppner, F. L., Arrighi, I., Kalinke, U., & Aguzzi, A. (2001). Immunity against prions? *Trends Mol Med*, 7(11), 477-479.

- Herms, J. W., Kretzschmar, H. A., Titz, S., & Keller, B. U. (1995). Patch-clamp Analysis of Synaptic Transmission to Cerebellar Purkinje Cells of Prion Protein Knockout Mice. *European Journal of Neuroscience*, 7(12), 2508-2512. doi: 10.1111/j.1460-9568.1995.tb01049.x
- Herrmann, U. S., Sonati, T., Falsig, J., Reimann, R. R., Dametto, P., O'Connor, T., . . . Aguzzi, A. (2015). Prion infections and anti-PrP antibodies trigger converging neurotoxic pathways. *PLoS Pathog*, 11(2), e1004662. doi: 10.1371/journal.ppat.1004662
- Hilton, D. A. (2006). Pathogenesis and prevalence of variant Creutzfeldt–Jakob disease. *J Pathol*, 208(2), 134-141. doi: 10.1002/path.1880
- Hill, A. F., Antoniou, M., & Collinge, J. (1999). Protease-resistant prion protein produced in vitro lacks detectable infectivity. *Journal of General Virology*, 80(1), 11-14. doi: doi:10.1099/0022-1317-80-1-11
- Hill, A. F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K. C., Gowland, I., Collinge, J., . . . Lantos, P. (1997). The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature*, 389(6650), 448-450, 526. doi: 10.1038/38925
- Hill, A. F., Joiner, S., Linehan, J., Desbruslais, M., Lantos, P. L., & Collinge, J. (2000). Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(18), 10248-10253.
- Hoffmann, C., Ziegler, U., Buschmann, A., Weber, A., Kupfer, L., Oelschlegel, A., . . . Groschup, M. H. (2007). Prions spread via the autonomic nervous system from the gut to the central nervous system in cattle incubating bovine spongiform encephalopathy. *Journal of General Virology*, 88(3), 1048-1055. doi: doi:10.1099/vir.0.82186-0
- Horiuchi, M., & Caughey, B. (1999). Specific binding of normal prion protein to the scrapie form via a localized domain initiates its conversion to the protease-resistant state. *The EMBO Journal*, 18(12), 3193-3203. doi: 10.1093/emboj/18.12.3193
- Horonchik, L., Tzaban, S., Ben-Zaken, O., Yedidia, Y., Rouvinski, A., Papy-Garcia, D., . . . Taraboulos, A. (2005). Heparan Sulfate Is a Cellular Receptor for Purified Infectious Prions. *Journal of Biological Chemistry*, 280(17), 17062-17067. doi: 10.1074/jbc.M500122200
- Hsiao, K., Baker, H. F., Crow, T. J., Poulter, M., Owen, F., Terwilliger, J. D., . . . Prusiner, S. B. (1989). Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. *Nature*, 338(6213), 342-345. doi: 10.1038/338342a0
- Hsiao, K. K., Scott, M., Foster, D., Groth, D. F., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (1990). Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with mutant prion protein. *Science*, 250(4987), 1587-1590.
- Immel, F., Jiang, Y., Wang, Y.-Q., Marchal, C., Maillet, L., Perrett, S., & Cullin, C. (2007). In Vitro Analysis of SpUre2p, a Prion-related Protein, Exemplifies the Relationship between

- Amyloid and Prion. *Journal of Biological Chemistry*, 282(11), 7912-7920. doi: 10.1074/jbc.M608652200
- Imran, M., & Mahmood, S. (2011a). An overview of animal prion diseases. *Virology*, 8, 493. doi: 10.1186/1743-422X-8-493
- Imran, M., & Mahmood, S. (2011b). An overview of human prion diseases. *Virology*, 8, 559. doi: 10.1186/1743-422X-8-559
- Inoue, H., Nojima, H., & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96(1), 23-28.
- Inoue, S., Tanaka, M., Horiuchi, M., Ishiguro, N., & Shinagawa, M. (1997). Characterization of the Bovine Prion Protein Gene: The Expression Requires Interaction between the Promoter and Intron. *Journal of Veterinary Medical Science*, 59(3), 175-183. doi: 10.1292/jvms.59.175
- Iwamaru, Y., Takenouchi, T., Imamura, M., Shimizu, Y., Miyazawa, K., Mohri, S., . . . Kitani, H. (2013). Prion replication elicits cytopathic changes in differentiated neurosphere cultures. *Journal of Virology*. doi: 10.1128/jvi.00572-13
- Jackson, W. S., Borkowski, A. W., Faas, H., Steele, A. D., King, O. D., Watson, N., . . . Lindquist, S. (2009). Spontaneous generation of prion infectivity in fatal familial insomnia knockin mice. *Neuron*, 63(4), 438-450. doi: S0896-6273(09)00581-9 [pii]10.1016/j.neuron.2009.07.026
- Jakob, A. (1921). Über eigenartige erkrankungen des zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen befunde. *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie*, 64(1), 147-228. doi: 10.1007/BF02870932
- Jeffrey, M., Goodbrand, I. A., & Goodsir, C. M. (1995). Pathology of the transmissible spongiform encephalopathies with special emphasis on ultrastructure. *Micron*, 26(3), 277-298. doi: 096843289500004N [pii]
- Jeffrey, M., & Wells, G. A. (1988). Spongiform encephalopathy in a nyala (*Tragelaphus angasi*). *Vet Pathol*, 25(5), 398-399.
- Jeong, B. H., & Kim, Y. S. (2014). Genetic Studies in Human Prion Diseases. *J Korean Med Sci*, 29(5), 623-632. doi: 10.3346/jkms.2014.29.5.623
- Jouvin-Marche, E., Attuil-Audenis, V., Aude-Garcia, C., Rachidi, W., Zabel, M., Podevin-Dimster, V., . . . Marche, P. N. (2006). Overexpression of Cellular Prion Protein Induces an Antioxidant Environment Altering T Cell Development in the Thymus. *The Journal of Immunology*, 176(6), 3490-3497. doi: 10.4049/jimmunol.176.6.3490
- Kaneko, K., Zulianello, L., Scott, M., Cooper, C. M., Wallace, A. C., James, T. L., . . . Prusiner, S. B. (1997). Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(19), 10069-10074.

- Kanu, N., Imokawa, Y., Drechsel, D. N., Williamson, R. A., Birkett, C. R., Bostock, C. J., & Brockes, J. P. (2002). Transfer of Scrapie Prion Infectivity by Cell Contact in Culture. *Current Biology*, *12*(7), 523-530.
- Kascsak, R. J., Rubenstein, R., Merz, P. A., Carp, R. I., Wisniewski, H. M., & Diringer, H. (1985). Biochemical Differences among Scrapie-associated Fibrils Support the Biological Diversity of Scrapie Agents. *Journal of General Virology*, *66*(8), 1715-1722. doi: doi:10.1099/0022-1317-66-8-1715
- Kazlauskaitė, J., Young, A., Gardner, C. E., Macpherson, J. V., Vénien-Bryan, C., & Pinheiro, T. J. T. (2005). An unusual soluble β -turn-rich conformation of prion is involved in fibril formation and toxic to neuronal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *328*(1), 292-305.
- Khalifé, M., Reine, F., Paquet-Fifield, S., Castille, J., Herzog, L., Vilotte, M., . . . Vilotte, J.-L. (2016). Mutated but Not Deleted Ovine PrP(C) N-Terminal Polybasic Region Strongly Interferes with Prion Propagation in Transgenic Mice. *Journal of Virology*, *90*(3), 1638-1646. doi: 10.1128/JVI.02805-15
- Khosravani, H., Zhang, Y., Tsutsui, S., Hameed, S., Altier, C., Hamid, J., . . . Zamponi, G. W. (2008). Prion protein attenuates excitotoxicity by inhibiting NMDA receptors. *J Cell Biol*, *181*(3), 551-565. doi: 10.1083/jcb.200711002
- Kim, J.-I., Surewicz, K., Gambetti, P., & Surewicz, W. K. (2009). The role of glycoposphatidylinositol anchor in the amplification of the scrapie isoform of prion protein in vitro. *FEBS Letters*, *583*(22), 3671-3675. doi: 10.1016/j.febslet.2009.10.049
- Kim, J. I., Cali, I., Surewicz, K., Kong, Q., Raymond, G. J., Atarashi, R., . . . Surewicz, W. K. (2010). Mammalian prions generated from bacterially expressed prion protein in the absence of any mammalian cofactors. *J Biol Chem*, *285*(19), 14083-14087. doi: C110.113464 [pii]10.1074/jbc.C110.113464
- Kimberlin, R. H., Cole, S., & Walker, C. A. (1987). Temporary and permanent modifications to a single strain of mouse scrapie on transmission to rats and hamsters. *J Gen Virol*, *68* (Pt 7), 1875-1881.
- Kimberlin, R. H., Hall, S. M., & Walker, C. A. (1983). Pathogenesis of mouse scrapie. *Journal of the Neurological Sciences*, *61*(3), 315-325.
- Kimberlin, R. H., Walker, C. A., & Fraser, H. (1989). The genomic identity of different strains of mouse scrapie is expressed in hamsters and preserved on reisolation in mice. *J Gen Virol*, *70* (Pt 8), 2017-2025.

- Kirkwood, J. K., Wells, G. A., Wilesmith, J. W., Cunningham, A. A., & Jackson, S. I. (1990). Spongiform encephalopathy in an arabian oryx (*Oryx leucoryx*) and a greater kudu (*Tragelaphus strepsiceros*). *Vet Rec*, *127*(17), 418-420.
- Kitamoto, T., Yamaguchi, K., Doh-ura, K., & Tateishi, J. (1991). A prion protein missense variant is integrated in kuru plaque cores in patients with Gerstmann-Sträussler syndrome. *Neurology*, *41*(2 Part 1), 306. doi: 10.1212/WNL.41.2_Part_1.306
- Klatzo, I., Gajdusek, D. C., & Zigas, V. (1959). Pathology of Kuru. *Lab Invest*, *8*(4), 799-847.
- Kocisko, D. A., Come, J. H., Priola, S. A., Chesebro, B., Raymond, G. J., Lansbury, P. T., & Caughey, B. (1994). Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature*, *370*(6489), 471-474. doi: 10.1038/370471a0
- Kovacs, G. G., & Budka, H. (2009). Molecular Pathology of Human Prion Diseases. *Int J Mol Sci*, *10*(3), 976-999. doi: 10.3390/ijms10030976
- Kovacs, G. G., Puopolo, M., Ladogana, A., Pocchiari, M., Budka, H., van Duijn, C., . . . Eurocjd. (2005). Genetic prion disease: the EUROCD experience. *Hum Genet*, *118*(2), 166-174. doi: 10.1007/s00439-005-0020-1
- Kraus, A., Groveman, B. R., & Caughey, B. (2013). Prions and the Potential Transmissibility of Protein Misfolding Diseases(). *Annual review of microbiology*, *67*, 543-564. doi: 10.1146/annurev-micro-092412-155735
- Kretzschmar, H. A., Stowring, L. E., Westaway, D., Stubblebine, W. H., Prusiner, S. B., & Dearmond, S. J. (1986). Molecular cloning of a human prion protein cDNA. *DNA*, *5*(4), 315-324.
- Kupfer, L., Eiden, M., Buschmann, A., & Groschup, M. H. (2007). Amino acid sequence and prion strain specific effects on the in vitro and in vivo convertibility of ovine/murine and bovine/murine prion protein chimeras. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1772*(6), 704-713.
- Lasmézas, C. I., Deslys, J.-P., Robain, O., Jaegly, A., Beringue, V., Peyrin, J.-M., . . . Dormont, D. (1997). Transmission of the BSE Agent to Mice in the Absence of Detectable Abnormal Prion Protein. *Science*, *275*(5298), 402-404. doi: 10.1126/science.275.5298.402
- Laude, H., Vilette, D., Le Dur, A., Archer, F., Soulier, S., Besnard, N., . . . Vilotte, J. L. (2002). New in vivo and ex vivo models for the experimental study of sheep scrapie: development and perspectives. *C R Biol*, *325*(1), 49-57.
- Lawson, V. A., Collins, S. J., Masters, C. L., & Hill, A. F. (2005). Prion protein glycosylation. *Journal of Neurochemistry*, *93*(4), 793-801. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03104.x
- Legname, G., Baskakov, I. V., Nguyen, H.-O. B., Riesner, D., Cohen, F. E., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (2004). Synthetic Mammalian Prions. *Science*, *305*(5684), 673-676. doi: 10.1126/science.1100195

- Legname, G., Nguyen, H.-O. B., Peretz, D., Cohen, F. E., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (2006). Continuum of prion protein structures enciphers a multitude of prion isolate-specified phenotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(50), 19105-19110. doi: 10.1073/pnas.0608970103
- Levavasseur, E., Biacabe, A.-G., Comoy, E., Culeux, A., Grznarova, K., Privat, N., . . . Haïk, S. (2017). Detection and partial discrimination of atypical and classical bovine spongiform encephalopathies in cattle and primates using real-time quaking-induced conversion assay. *PLoS One*, *12*(2), e0172428. doi: 10.1371/journal.pone.0172428
- Li, A., Christensen, H. M., Stewart, L. R., Roth, K. A., Chiesa, R., & Harris, D. A. (2007). Neonatal lethality in transgenic mice expressing prion protein with a deletion of residues 105–125. *The EMBO Journal*, *26*(2), 548-558. doi: 10.1038/sj.emboj.7601507
- Li, A., Piccardo, P., Barmada, S. J., Ghetti, B., & Harris, D. A. (2007). Prion protein with an octapeptide insertion has impaired neuroprotective activity in transgenic mice. *The EMBO Journal*, *26*(11), 2777-2785. doi: 10.1038/sj.emboj.7601726
- Li, B., Qing, L., Yan, J., & Kong, Q. (2011). Instability of the Octarepeat Region of the Human Prion Protein Gene. *PLoS One*, *6*(10), e26635. doi: 10.1371/journal.pone.0026635
- Liemann, S., & Glockshuber, R. (1999). Influence of Amino Acid Substitutions Related to Inherited Human Prion Diseases on the Thermodynamic Stability of the Cellular Prion Protein. *Biochemistry*, *38*(11), 3258-3267. doi: 10.1021/bi982714g
- Ligios, C., Sigurdson, C. J., Santucci, C., Carcassola, G., Manco, G., Basagni, M., . . . Aguzzi, A. (2005). PrP^{Sc} in mammary glands of sheep affected by scrapie and mastitis. *Nat Med*, *11*(11), 1137-1138. doi: 10.1038/nm1105-1137
- Linden, R., Martins, V. R., Prado, M. A. M., Cammarota, M., Izquierdo, I., & Brentani, R. R. (2008). Physiology of the Prion Protein. *Physiological Reviews*, *88*(2), 673-728. doi: 10.1152/physrev.00007.2007
- Locht, C., Chesebro, B., Race, R., & Keith, J. M. (1986). Molecular cloning and complete sequence of prion protein cDNA from mouse brain infected with the scrapie agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *83*(17), 6372-6376.
- Lugaresi, E., Medori, R., Montagna, P., Baruzzi, A., Cortelli, P., Lugaresi, A., . . . Gambetti, P. (1986). Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N Engl J Med*, *315*(16), 997-1003. doi: 10.1056/NEJM198610163151605
- Luhr, K. M., Nordström, E. K., Löw, P., Ljunggren, H.-G., Taraboulos, A., & Kristensson, K. (2004). Scrapie Protein Degradation by Cysteine Proteases in CD11c+ Dendritic Cells and GT1-1 Neuronal Cells. *Journal of Virology*, *78*(9), 4776-4782. doi: 10.1128/jvi.78.9.4776-4782.2004

- Lloyd, S., Mead, S., & Collinge, J. (2011). Genetics of Prion Disease. In J. Tatzelt (Ed.), *Prion Proteins* (pp. 1-22). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- M. Danzer, K., & J. McLean, P. (2011). Drug Targets from Genetics: Alpha-Synuclein. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets- CNS & Neurological Disorders*, 10(6), 712-723. doi: 10.2174/187152711797247867
- Ma, J. (2012). The Role of Cofactors in Prion Propagation and Infectivity. *PLOS Pathogens*, 8(4), e1002589. doi: 10.1371/journal.ppat.1002589
- Ma, J., Wollmann, R., & Lindquist, S. (2002). Neurotoxicity and Neurodegeneration When PrP Accumulates in the Cytosol. *Science*, 298(5599), 1781-1785. doi: 10.1126/science.1073725
- Magalhães, A. C., Baron, G. S., Lee, K. S., Steele-Mortimer, O., Dorward, D., Prado, M. A. M., & Caughey, B. (2005). Uptake and Neuritic Transport of Scrapie Prion Protein Coincident with Infection of Neuronal Cells. *The Journal of Neuroscience*, 25(21), 5207-5216. doi: 10.1523/jneurosci.0653-05.2005
- Mahal, S. P., Asante, E. A., Antoniou, M., & Collinge, J. (2001). Isolation and functional characterisation of the promoter region of the human prion protein gene. *Gene*, 268(1-2), 105-114. doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00424-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00424-3)
- Mahal, S. P., Baker, C. A., Demczyk, C. A., Smith, E. W., Julius, C., & Weissmann, C. (2007). Prion strain discrimination in cell culture: the cell panel assay. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(52), 20908-20913. doi: 0710054104 [pii]10.1073/pnas.0710054104
- Makarava, N., Kovacs, G. G., Bocharova, O., Savtchenko, R., Alexeeva, I., Budka, H., . . . Baskakov, I. V. (2010). Recombinant prion protein induces a new transmissible prion disease in wild-type animals. *Acta Neuropathol*, 119(2), 177-187. doi: 10.1007/s00401-009-0633-x
- Mallucci, G. R., White, M. D., Farmer, M., Dickinson, A., Khatun, H., Powell, A. D., . . . Collinge, J. (2007). Targeting Cellular Prion Protein Reverses Early Cognitive Deficits and Neurophysiological Dysfunction in Prion-Infected Mice. *Neuron*, 53(3), 325-335. doi: 10.1016/j.neuron.2007.01.005
- Manson, J., West, J. D., Thomson, V., McBride, P., Kaufman, M. H., & Hope, J. (1992). The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development*, 115(1), 117-122.
- Manson, J. C., Clarke, A. R., Hooper, M. L., Aitchison, L., McConnell, I., & Hope, J. (1994). 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Molecular Neurobiology*, 8(2), 121-127. doi: 10.1007/bf02780662
- Marsh, R. F., Bessen, R. A., Lehmann, S., & Hartsough, G. R. (1991). Epidemiological and experimental studies on a new incident of transmissible mink encephalopathy. *J Gen Virol*, 72 (Pt 3), 589-594. doi: 10.1099/0022-1317-72-3-589

- Marsh, R. F., & Hadlow, W. J. (1992). Transmissible mink encephalopathy. *Rev Sci Tech*, *11*(2), 539-550.
- Martínez-Lage, J. F., Poza, M., Sola, J., Tortosa, J. G., Brown, P., Cervenáková, L., . . . Mendoza, A. (1994). Accidental transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by dural cadaveric grafts. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *57*(9), 1091-1094.
- Masel, J., & Jansen, V. A. (2001). The measured level of prion infectivity varies in a predictable way according to the aggregation state of the infectious agent. *Biochim Biophys Acta*, *1535*(2), 164-173. doi: S0925-4439(00)00095-8 [pii]
- Masel, J., Jansen, V. A., & Nowak, M. A. (1999). Quantifying the kinetic parameters of prion replication. *Biophys Chem*, *77*(2-3), 139-152.
- Masters, C. L., Gajdusek, D. C., & Gibbs, C. J., Jr. (1981). Creutzfeldt-Jakob disease virus isolations from the Gerstmann-Straussler syndrome with an analysis of the various forms of amyloid plaque deposition in the virus-induced spongiform encephalopathies. *Brain*, *104*(3), 559-588.
- Mattei, V., Garofalo, T., Misasi, R., Circella, A., Manganelli, V., Lucania, G., . . . Sorice, M. (2004). Prion protein is a component of the multimolecular signaling complex involved in T cell activation. *FEBS Letters*, *560*(1-3), 14-18. doi: 10.1016/S0014-5793(04)00029-8
- McBride, P. A., Schulz-Schaeffer, W. J., Donaldson, M., Bruce, M., Diringer, H., Kretzschmar, H. A., & Beekes, M. (2001). Early Spread of Scrapie from the Gastrointestinal Tract to the Central Nervous System Involves Autonomic Fibers of the Splanchnic and Vagus Nerves. *Journal of Virology*, *75*(19), 9320-9327. doi: 10.1128/JVI.75.19.9320-9327.2001
- McDonald, A. J., Dibble, J. P., Evans, E. G. B., & Millhauser, G. L. (2014). A New Paradigm for Enzymatic Control of α -Cleavage and β -Cleavage of the Prion Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, *289*(2), 803-813. doi: 10.1074/jbc.M113.502351
- McDonald, A. J., & Millhauser, G. L. (2014). PrP overdrive: Does inhibition of α -cleavage contribute to PrP(C) toxicity and prion disease? *Prion*, *8*(2), 183-191. doi: 10.4161/pri.28796
- McGowan, J. P. (1922). Scrapie in sheep. *Scottish J Agric*, *5*, 365-375.
- McKinley, M. P., Braunfeld, M. B., Bellinger, C. G., & Prusiner, S. B. (1986). Molecular Characteristics of Prion Rods Purified from Scrapie-Infected Hamster Brains. *The Journal of Infectious Diseases*, *154*(1), 110-120. doi: 10.1093/infdis/154.1.110
- McLennan, N. F., Brennan, P. M., McNeill, A., Davies, I., Fotheringham, A., Rennison, K. A., . . . Bell, J. E. (2004). Prion Protein Accumulation and Neuroprotection in Hypoxic Brain Damage. *The American Journal of Pathology*, *165*(1), 227-235.
- Mead, S., Poulter, M., Beck, J., Webb, T. E. F., Campbell, T. A., Linehan, J. M., . . . Collinge, J. (2006). Inherited prion disease with six octapeptide repeat insertional mutation—molecular

- analysis of phenotypic heterogeneity. *Brain*, 129(9), 2297-2317. doi: 10.1093/brain/awl226
- Meade-White, K., Race, B., Trifilo, M., Bossers, A., Favara, C., Lacasse, R., . . . Chesebro, B. (2007). Resistance to Chronic Wasting Disease in Transgenic Mice Expressing a Naturally Occurring Allelic Variant of Deer Prion Protein. *Journal of Virology*, 81(9), 4533-4539. doi: 10.1128/JVI.02762-06
- Medori, R., Tritschler, H. J., LeBlanc, A., Villare, F., Manetto, V., Chen, H. Y., . . . et al. (1992). Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene. *N Engl J Med*, 326(7), 444-449. doi: 10.1056/NEJM199202133260704
- Mehrpour, M., & Codogno, P. (2010). Prion protein: From physiology to cancer biology. *Cancer Lett*, 290(1), 1-23. doi: 10.1016/j.canlet.2009.07.009
- Meier, P., Genoud, N., Prinz, M., Maissen, M., Rulicke, T., Zurbriggen, A., . . . Aguzzi, A. (2003). Soluble dimeric prion protein binds PrP(Sc) in vivo and antagonizes prion disease. *Cell*, 113(1), 49-60.
- Merz, P. A., Somerville, R. A., Wisniewski, H. M., & Iqbal, K. (1981). Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta Neuropathologica*, 54(1), 63-74. doi: 10.1007/bf00691333
- Meyer, R. K., McKinley, M. P., Bowman, K. A., Braunfeld, M. B., Barry, R. A., & Prusiner, S. B. (1986). Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(8), 2310-2314.
- Miller, M. B., Geoghegan, J. C., & Supattapone, S. (2011). Dissociation of Infectivity from Seeding Ability in Prions with Alternate Docking Mechanism. *PLOS Pathogens*, 7(7), e1002128. doi: 10.1371/journal.ppat.1002128
- Minikel, Eric V., Zerr, I., Collins, Steven J., Ponto, C., Boyd, A., Klug, G., . . . Geschwind, Michael D. (2014). Ascertainment Bias Causes False Signal of Anticipation in Genetic Prion Disease. *Am J Hum Genet*, 95(4), 371-382. doi: 10.1016/j.ajhg.2014.09.003
- Mishra, R. S., Basu, S., Gu, Y., Luo, X., Zou, W.-Q., Mishra, R., . . . Singh, N. (2004). Protease-Resistant Human Prion Protein and Ferritin Are Cotransported across Caco-2 Epithelial Cells: Implications for Species Barrier in Prion Uptake from the Intestine. *The Journal of Neuroscience*, 24(50), 11280-11290. doi: 10.1523/jneurosci.2864-04.2004
- Moore, R. C., Lee, I. Y., Silverman, G. L., Harrison, P. M., Strome, R., Heinrich, C., . . . Westaway, D. (1999). Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel1. *Journal of Molecular Biology*, 292(4), 797-817. doi: <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3108>
- Moreno, J. A., Halliday, M., Molloy, C., Radford, H., Verity, N., Axten, J. M., . . . Mallucci, G. R. (2013). Oral Treatment Targeting the Unfolded Protein Response Prevents Neurodegeneration and

- Clinical Disease in Prion-Infected Mice. *Science Translational Medicine*, 5(206), 206ra138-206ra138. doi: 10.1126/scitranslmed.3006767
- Moreno, J. A., Radford, H., Peretti, D., Steinert, J. R., Verity, N., Martin, M. G., . . . Mallucci, G. R. (2012). Sustained translational repression by eIF2 α -P mediates prion neurodegeneration. *Nature*, 485(7399), 507-511. doi: 10.1038/nature11058
- Muramoto, T., DeArmond, S. J., Scott, M., Telling, G. C., Cohen, F. E., & Prusiner, S. B. (1997). Heritable disorder resembling neuronal storage disease in mice expressing prion protein with deletion of an α -helix. *Nature Medicine*, 3(7), 750-755. doi: 10.1038/nm0797-750
- Murayama, Y., Yoshioka, M., Masujin, K., Okada, H., Iwamaru, Y., Imamura, M., . . . Mohri, S. (2010). Sulfated Dextrans Enhance In Vitro Amplification of Bovine Spongiform Encephalopathy PrP(Sc) and Enable Ultrasensitive Detection of Bovine PrP(Sc). *PLoS One*, 5(10), e13152. doi: 10.1371/journal.pone.0013152
- Nazor, K. E., Kuhn, F., Seward, T., Green, M., Zwald, D., Pürro, M., . . . Telling, G. C. (2005). Immunodetection of disease-associated mutant PrP, which accelerates disease in GSS transgenic mice. *The EMBO Journal*, 24(13), 2472-2480. doi: 10.1038/sj.emboj.7600717
- Nelson, R., Sawaya, M. R., Balbirnie, M., Madsen, A. Ø., Riek, C., Grothe, R., & Eisenberg, D. (2005). Structure of the cross- β spine of amyloid-like fibrils. *Nature*, 435(7043), 773-778. doi: 10.1038/nature03680
- Neutra, M. R., Frey, A., & Kraehenbuhl, J.-P. (1996). Epithelial M Cells: Gateways for Mucosal Infection and Immunization. *Cell*, 86(3), 345-348. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80106-3
- Nicolas, O., Gavín, R., & del Río, J. A. (2009). New insights into cellular prion protein (PrP^c) functions: The “ying and yang” of a relevant protein. *Brain Research Reviews*, 61(2), 170-184.
- Nonno, R., Bari, M. A. D., Cardone, F., Vaccari, G., Fazzi, P., Dell'Omo, G., . . . Agrimi, U. (2006). Efficient Transmission and Characterization of Creutzfeldt-Jakob Disease Strains in Bank Voles. *PLoS Pathogens*, 2(2), e12. doi: 10.1371/journal.ppat.0020012
- Nunziante, M., Gilch, S., & Schätzl, H. M. (2003). Prion Diseases: From Molecular Biology to Intervention Strategies. *Chembiochem*, 4(12), 1268-1284. doi: 10.1002/cbic.200300704
- Nuvolone, M., Aguzzi, A., & Heikenwalder, M. (2009). Cells and prions: a license to replicate. *FEBS Lett*, 583(16), 2674-2684. doi: 10.1016/j.febslet.2009.06.014
- O'Rourke, K. I., Schneider, D. A., Spraker, T. R., Dassanayake, R. P., Highland, M. A., Zhuang, D., & Truscott, T. C. (2012). Transmissibility of caprine scrapie in ovine transgenic mice. *BMC Vet Res*, 8, 42-42. doi: 10.1186/1746-6148-8-42
- Oelschlegel, A. M., & Weissmann, C. (2013). Acquisition of Drug Resistance and Dependence by Prions. *PLoS Pathogens*, 9(2), e1003158. doi: 10.1371/journal.ppat.1003158

- Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M. P., Kent, S. B., Aebersold, R., . . . et al. (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*, *40*(4), 735-746. doi: 0092-8674(85)90333-2 [pii]
- Orrú, C. D., Bongianni, M., Tonoli, G., Ferrari, S., Hughson, A. G., Groveman, B. R., . . . Zanusso, G. (2014). A Test for Creutzfeldt–Jakob Disease Using Nasal Brushings. *The New England journal of medicine*, *371*(6), 519-529. doi: 10.1056/NEJMoa1315200
- Orrú, C. D., Groveman, B. R., Hughson, A. G., Zanusso, G., Coulthart, M. B., & Caughey, B. (2015). Rapid and Sensitive RT-QuIC Detection of Human Creutzfeldt-Jakob Disease Using Cerebrospinal Fluid. *MBio*, *6*(1), e02451-02414. doi: 10.1128/mBio.02451-14
- Orrú, C. D., Groveman, B. R., Raymond, L. D., Hughson, A. G., Nonno, R., Zou, W., . . . Caughey, B. (2015). Bank Vole Prion Protein As an Apparently Universal Substrate for RT-QuIC-Based Detection and Discrimination of Prion Strains. *PLOS Pathogens*, *11*(6), e1004983. doi: 10.1371/journal.ppat.1004983
- Ostapchenko, V. G., Makarava, N., Savtchenko, R., & Baskakov, I. V. (2008). The polybasic N-terminal region of the prion protein controls the physical properties of both the cellular and fibrillar forms of PrP. *Journal of Molecular Biology*, *383*(5), 1210-1224. doi: 10.1016/j.jmb.2008.08.073
- Owen, F., Poulter, M., Shah, T., Collinge, J., Lofthouse, R., Baker, H., . . . Crow, T. J. (1990). An in-frame insertion in the prion protein gene in familial Creutzfeldt-Jakob disease. *Molecular Brain Research*, *7*(3), 273-276.
- Palmer, M. S., Dryden, A. J., Hughes, J. T., & Collinge, J. (1991). Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature*, *352*(6333), 340-342. doi: 10.1038/352340a0
- Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., . . . et al. (1993). Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *90*(23), 10962-10966.
- Pan, T., Wong, B.-S., Liu, T., Li, R., Petersen, R. B., & Sy, M.-S. (2002). Cell-surface prion protein interacts with glycosaminoglycans. *Biochemical Journal*, *368*(Pt 1), 81-90. doi: 10.1042/BJ20020773
- Paquet, S., Langevin, C., Chapuis, J., Jackson, G. S., Laude, H., & Vilette, D. (2007). Efficient dissemination of prions through preferential transmission to nearby cells. *Journal of General Virology*, *88*(2), 706-713. doi: doi:10.1099/vir.0.82336-0
- Parchi, P., Chen, S. G., Brown, P., Zou, W., Capellari, S., Budka, H., . . . Gambetti, P. (1998). Different patterns of truncated prion protein fragments correlate with distinct phenotypes in P102L Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(14), 8322-8327.

- Parchi, P., Strammiello, R., Giese, A., & Kretzschmar, H. (2011). Phenotypic variability of sporadic human prion disease and its molecular basis: past, present, and future. *Acta Neuropathologica*, *121*(1), 91-112. doi: 10.1007/s00401-010-0779-6
- Parkin, E. T., Watt, N. T., Hussain, I., Eckman, E. A., Eckman, C. B., Manson, J. C., . . . Hooper, N. M. (2007). Cellular prion protein regulates β -secretase cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(26), 11062-11067. doi: 10.1073/pnas.0609621104
- Pastrana, M. A., Sajnani, G., Onisko, B., Castilla, J., Morales, R., Soto, C., & Requena, J. R. (2006). Isolation and Characterization of a Proteinase K-Sensitive PrPSc Fraction. *Biochemistry*, *45*(51), 15710-15717. doi: 10.1021/bi0615442
- Pattison, I. H., Gordon, W. S. a., & Millson, G. C. (1959). Experimental production of scrapie in goats. *J comp Path Ther*, *69*, 300-312.
- Pattison, I. H., & Millson, G. C. (1961). Scrapie Produced Experimentally in Goats With Special Reference To the Clinical Syndrome. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, *71*, 101-IN110.
- Pattison, J. (1998). The emergence of bovine spongiform encephalopathy and related diseases. *Emerging Infectious Diseases*, *4*(3), 390-394.
- Pearson, G. R., Wyatt, J. M., Gruffydd-Jones, T. J., Hope, J., Chong, A., Higgins, R. J., . . . Wells, G. A. (1992). Feline spongiform encephalopathy: fibril and PrP studies. *Vet Rec*, *131*(14), 307-310.
- Peretz, D., Williamson, R. A., Matsunaga, Y., Serban, H., Pinilla, C., Bastidas, R. B., . . . Burton, D. R. (1997). A conformational transition at the N terminus of the prion protein features in formation of the scrapie isoform¹¹Edited by M. Yaniv. *Journal of Molecular Biology*, *273*(3), 614-622.
- Pergami, P., Jaffe, H., & Safar, J. (1996). Semipreparative chromatographic method to purify the normal cellular isoform of the prion protein in nondenatured form. *Anal Biochem*, *236*(1), 63-73. doi: S0003-2697(96)90132-3 [pii]10.1006/abio.1996.0132
- Perry, H. V., Cunningham, C., & Boche, D. (2002). Atypical inflammation in the central nervous system in prion disease. *Current Opinion in Neurology*, *15*(3), 349-354.
- Petit, C. S. V., Besnier, L., Morel, E., Rousset, M., & Thenet, S. (2013). Roles of the cellular prion protein in the regulation of cell-cell junctions and barrier function. *Tissue Barriers*, *1*(2), e24377. doi: 10.4161/tisb.24377
- Piccardo, P., Dlouhy, S. R., Lievens, P. M., Young, K., Bird, T. D., Nochlin, D., . . . Ghetti, B. (1998). Phenotypic variability of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease is associated with prion protein heterogeneity. *J Neuropathol Exp Neurol*, *57*(10), 979-988.

- Piccardo, P., Liepnieks, J. J., William, A., Dlouhy, S. R., Farlow, M. R., Young, K., . . . Ghetti, B. (2001). Prion proteins with different conformations accumulate in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease caused by A117V and F198S mutations. *Am J Pathol*, *158*(6), 2201-2207. doi: S0002-9440(10)64692-5 [pii]10.1016/S0002-9440(10)64692-5
- Pirisinu, L., Nonno, R., Esposito, E., Benestad, S. L., Gambetti, P., Agrimi, U., & Zou, W. Q. (2013). Small ruminant nor98 prions share biochemical features with human gerstmann-straussler-scheinker disease and variably protease-sensitive prionopathy. *PLoS One*, *8*(6), e66405. doi: 10.1371/journal.pone.0066405
- Pocchiarri, M., Puopolo, M., Croes, E. A., Budka, H., Gelpi, E., Collins, S., . . . Will, R. G. (2004). Predictors of survival in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and other human transmissible spongiform encephalopathies. *Brain*, *127*(Pt 10), 2348-2359. doi: 10.1093/brain/awh249
- Prestori, F., Rossi, P., Bearzatto, B., Lainé, J., Necchi, D., Diwakar, S., . . . D'Angelo, E. (2008). Altered Neuron Excitability and Synaptic Plasticity in the Cerebellar Granular Layer of Juvenile Prion Protein Knock-Out Mice with Impaired Motor Control. *The Journal of Neuroscience*, *28*(28), 7091-7103. doi: 10.1523/jneurosci.0409-08.2008
- Priola, S. A., & Chesebro, B. (1995). A single hamster PrP amino acid blocks conversion to protease-resistant PrP in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells. *Journal of Virology*, *69*(12), 7754-7758.
- Pruden, S. J., McAllister, M. M., Schultheiss, P. C., O'Toole, D., & Christensen, D. E. (2004). Abomasal emptying defect of sheep may be an acquired form of dysautonomia. *Vet Pathol*, *41*(2), 164-169. doi: 10.1354/vp.41-2-164
- Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, *216*(4542), 136-144.
- Prusiner, S. B. (1998). Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(23), 13363-13383.
- Prusiner, S. B., McKinley, M. P., Bowman, K. A., Bolton, D. C., Bendheim, P. E., Groth, D. F., & Glenner, G. G. (1983). Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell*, *35*(2 Pt 1), 349-358. doi: 0092-8674(83)90168-X [pii]
- Prusiner, S. B., McKinley, M. P., Groth, D. F., Bowman, K. A., Mock, N. I., Cochran, S. P., & Masiarz, F. R. (1981). Scrapie agent contains a hydrophobic protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *78*(11), 6675-6679.
- Prusiner, S. B., Scott, M., Foster, D., Pan, K. M., Groth, D., Mirenda, C., . . . et al. (1990). Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell*, *63*(4), 673-686. doi: 0092-8674(90)90134-Z [pii]
- Prusiner, S. B., Scott, M. R., DeArmond, S. J., & Cohen, F. E. (1998). Prion Protein Biology. *Cell*, *93*(3), 337-348. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81163-0

- Puig, B., Altmeyden, H., & Glatzel, M. (2014). The GPI-anchoring of PrP. *Prion*, *8*(1), 11-18. doi: 10.4161/pri.27892
- Pushie, M. J., Pickering, I. J., Martin, G. R., Tsutsui, S., Jirik, F. R., & George, G. N. (2011). Prion protein expression level alters regional copper, iron and zinc content in the mouse brain. *Metallomics*, *3*(2), 206-214. doi: 10.1039/C0MT00037J
- Race, B., Meade-White, K. D., Phillips, K., Striebel, J., Race, R., & Chesebro, B. (2014). Chronic Wasting Disease Agents in Nonhuman Primates. *Emerging Infectious Diseases*, *20*(5), 833-837. doi: 10.3201/eid2005.130778
- Race, R., Raines, A., Raymond, G. J., Caughey, B., & Chesebro, B. (2001). Long-Term Subclinical Carrier State Precedes Scrapie Replication and Adaptation in a Resistant Species: Analogies to Bovine Spongiform Encephalopathy and Variant Creutzfeldt-Jakob Disease in Humans. *Journal of Virology*, *75*(21), 10106-10112. doi: 10.1128/JVI.75.21.10106-10112.2001
- Race, R. E., Priola, S. A., Bessen, R. A., Ernst, D., Dockter, J., Rall, G. F., . . . Oldstone, M. B. A. (1995). Neuron-specific expression of a hamster prion protein minigene in transgenic mice induces susceptibility to hamster scrapie agent. *Neuron*, *15*(5), 1183-1191.
- Race, R. E., Raines, A., Baron, T. G., Miller, M. W., Jenny, A., & Williams, E. S. (2002). Comparison of abnormal prion protein glycoform patterns from transmissible spongiform encephalopathy agent-infected deer, elk, sheep, and cattle. *J Virol*, *76*(23), 12365-12368.
- Rangel, A., Burgaya, F., Gavin, R., Soriano, E., Aguzzi, A., & Del Rio, J. A. (2007). Enhanced susceptibility of Prnp-deficient mice to kainate-induced seizures, neuronal apoptosis, and death: Role of AMPA/kainate receptors. *J Neurosci Res*, *85*(12), 2741-2755. doi: 10.1002/jnr.21215
- Rangel, A., Madroñal, N., Massó, A. G. i., Gavín, R., Llorens, F., Sumoy, L., . . . Río, J. A. D. (2009). Regulation of GABA(A) and Glutamate Receptor Expression, Synaptic Facilitation and Long-Term Potentiation in the Hippocampus of Prion Mutant Mice. *PLoS One*, *4*(10), e7592. doi: 10.1371/journal.pone.0007592
- Raymond, C. R., Aucouturier, P., & Mabbott, N. A. (2007). In Vivo Depletion of CD11c⁺ Cells Impairs Scrapie Agent Neuroinvasion from the Intestine. *The Journal of Immunology*, *179*(11), 7758-7766. doi: 10.4049/jimmunol.179.11.7758
- Raymond, G. J., Bossers, A., Raymond, L. D., O'Rourke, K. I., McHolland, L. E., Bryant, P. K., 3rd, . . . Caughey, B. (2000). Evidence of a molecular barrier limiting susceptibility of humans, cattle and sheep to chronic wasting disease. *EMBO J*, *19*(17), 4425-4430. doi: 10.1093/emboj/19.17.4425
- Requena, J. R., & Wille, H. (2014). The structure of the infectious prion protein. *Prion*, *8*(1), 60-66. doi: 10.4161/pri.28368

- Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R., & Wüthrich, K. (1996). NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231). *Nature*, *382*(6587), 180-182.
- Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Glockshuber, R., & Wüthrich, K. (1997). NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Letters*, *413*(2), 282-288. doi: 10.1016/S0014-5793(97)00920-4
- Riek, R., Wider, G., Billeter, M., Hornemann, S., Glockshuber, R., & Wüthrich, K. (1998). Prion protein NMR structure and familial human spongiform encephalopathies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(20), 11667-11672.
- Rivera-Milla, E., Oidtmann, B., Panagiotidis, C. H., Baier, M., Sklaviadis, T., Hoffmann, R., . . . Málaga-Trillo, E. (2005). Disparate evolution of prion protein domains and the distinct origin of Doppel- and prion-related loci revealed by fish-to-mammal comparisons. *The FASEB Journal*. doi: 10.1096/fj.05-4279fje
- Rogers, M., Yehiely, F., Scott, M., & Prusiner, S. B. (1993). Conversion of truncated and elongated prion proteins into the scrapie isoform in cultured cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(8), 3182-3186.
- Saa, P., Castilla, J., & Soto, C. (2005). Cyclic amplification of protein misfolding and aggregation. *Methods Mol Biol*, *299*, 53-65. doi: 1-59259-874-9:053 [pii]
- Saa, P., Castilla, J., & Soto, C. (2006a). Presymptomatic detection of prions in blood. *Science*, *313*(5783), 92-94. doi: 313/5783/92 [pii]10.1126/science.1129051
- Saa, P., Castilla, J., & Soto, C. (2006b). Ultra-efficient replication of infectious prions by automated protein misfolding cyclic amplification. *J Biol Chem*, *281*(46), 35245-35252. doi: M603964200 [pii]10.1074/jbc.M603964200
- Saa, P., Sferrazza, G. F., Ottenberg, G., Oelschlegel, A. M., Dorsey, K., & Lasmezas, C. I. (2012). Strain-specific role of RNAs in prion replication. *J Virol*, *86*(19), 10494-10504. doi: JVI.01286-12 [pii]10.1128/JVI.01286-12
- Saborio, G. P., Permanne, B., & Soto, C. (2001). Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature*, *411*(6839), 810-813. doi: 10.1038/35081095
- Safar, J., Roller, P. P., Gajdusek, D. C., & Gibbs, C. J. (1993). Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(27), 20276-20284.
- Safar, J., Wille, H., Itri, V., Groth, D., Serban, H., Torchia, M., . . . Prusiner, S. B. (1998). Eight prion strains have PrP^{Sc} molecules with different conformations. *Nat Med*, *4*(10), 1157-1165.

- Safar, J. G., Geschwind, M. D., Deering, C., Didorenko, S., Sattavat, M., Sanchez, H., . . . Prusiner, S. B. (2005). Diagnosis of human prion disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(9), 3501-3506. doi: 10.1073/pnas.04096511102
- Sailer, A., Büeler, H., Fischer, M., Aguzzi, A., & Weissmann, C. (1994). No propagation of prions in mice devoid of PrP. *Cell*, *77*(7), 967-968. doi: 10.1016/0092-8674(94)90436-7
- Sakaguchi, S., Katamine, S., Nishida, N., Moriuchi, R., Shigematsu, K., Sugimoto, T., . . . Noda, T. (1996). Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature*, *380*(6574), 528-531.
- Sakudo, A., Lee, D.-c., Saeki, K., Nakamura, Y., Inoue, K., Matsumoto, Y., . . . Onodera, T. (2003). Impairment of superoxide dismutase activation by N-terminally truncated prion protein (PrP) in PrP-deficient neuronal cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *308*(3), 660-667. doi: [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)01459-1](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)01459-1)
- Scott, M., Foster, D., Mirenda, C., Serban, D., Coufal, F., Walchli, M., . . . Prusiner, S. B. (1989). Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell*, *59*(5), 847-857. doi: 0092-8674(89)90608-9 [pii]
- Scott, M., Groth, D., Foster, D., Torchia, M., Yang, S. L., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (1993). Propagation of prions with artificial properties in transgenic mice expressing chimeric PrP genes. *Cell*, *73*(5), 979-988. doi: 0092-8674(93)90275-U [pii]
- Scott, M. R., Kohler, R., Foster, D., & Prusiner, S. B. (1992). Chimeric prion protein expression in cultured cells and transgenic mice. *Protein Sci*, *1*(8), 986-997. doi: 10.1002/pro.5560010804
- Scheibel, T., & Lindquist, S. L. (2001). The role of conformational flexibility in prion propagation and maintenance for Sup35p. *Nat Struct Mol Biol*, *8*(11), 958-962.
- Serag, A. A., Altenbach, C., Gingery, M., Hubbell, W. L., & Yeates, T. O. (2002). Arrangement of subunits and ordering of [beta]-strands in an amyloid sheet. *Nat Struct Mol Biol*, *9*(10), 734-739.
- Serio, T. R., Cashikar, A. G., Kowal, A. S., Sawicki, G. J., Moslehi, J. J., Serpell, L., . . . Lindquist, S. L. (2000). Nucleated Conformational Conversion and the Replication of Conformational Information by a Prion Determinant. *Science*, *289*(5483), 1317-1321. doi: 10.1126/science.289.5483.1317
- Shen, L., & Ji, H.-F. (2011). Mutation directional selection sheds light on prion pathogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *410*(2), 159-163.
- Shmerling, D., Hegyi, I., Fischer, M., Blattler, T., Brandner, S., Gotz, J., . . . Weissmann, C. (1998). Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell*, *93*(2), 203-214.

- Shorter, J. (2010). Emergence and natural selection of drug-resistant prions. *Mol Biosyst*, 6(7), 1115-1130. doi: 10.1039/c004550k
- Shyng, S.-L., Moulder, K. L., Lesko, A., & Harris, D. A. (1995). The N-terminal Domain of a Glycolipid-anchored Prion Protein Is Essential for Its Endocytosis via Clathrin-coated Pits. *Journal of Biological Chemistry*, 270(24), 14793-14800. doi: 10.1074/jbc.270.24.14793
- Shyng, S. L., Heuser, J. E., & Harris, D. A. (1994). A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. *J Cell Biol*, 125(6), 1239-1250. doi: 10.1083/jcb.125.6.1239
- Sigurdson, C. J., Joshi-Barr, S., Bett, C., Winson, O., Manco, G., Schwarz, P., . . . Aguzzi, A. (2011). Spongiform encephalopathy in transgenic mice expressing a point mutation in the beta2-alpha2 loop of the prion protein. *J Neurosci*, 31(39), 13840-13847. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3504-11.2011
- Sigurdson, C. J., Manco, G., Schwarz, P., Liberski, P., Hoover, E. A., Hornemann, S., . . . Aguzzi, A. (2006). Strain fidelity of chronic wasting disease upon murine adaptation. *J Virol*, 80(24), 12303-12311. doi: 10.1128/JVI.01120-06
- Sigurdson, C. J., Nilsson, K. P., Hornemann, S., Manco, G., Fernandez-Borges, N., Schwarz, P., . . . Aguzzi, A. (2010). A molecular switch controls interspecies prion disease transmission in mice. *J Clin Invest*, 120(7), 2590-2599. doi: 10.1172/JCI42051
- Sigurdsson, B. (1954). Maedi, a slow progressing pneumonia of sheep: An epizootological and pathological study. *British Vet J.*, vol. 110, p.255-258.
- Silva, J. L., Vieira, T. C. R. G., Gomes, M. P. B., Rangel, L. P., Scapin, S. M. N., & Cordeiro, Y. (2011). Experimental approaches to the interaction of the prion protein with nucleic acids and glycosaminoglycans: Modulators of the pathogenic conversion. *Methods*, 53(3), 306-317.
- Silveira, J. R., Raymond, G. J., Hughson, A. G., Race, R. E., Sim, V. L., Caughey, B., & Hayes, S. F. (2005). The most infectious prion protein particles. *Nature*, 437(7056), 257-261. doi: 10.1038/nature03989
- Sim, V. L., & Caughey, B. (2009). Ultrastructures and strain comparison of under-glycosylated scrapie prion fibrils. *Neurobiology of Aging*, 30(12), 2031-2042. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2008.02.016
- Simoneau, S., Rezaei, H., Salès, N., Kaiser-Schulz, G., Lefebvre-Roque, M., Vidal, C., . . . Lasmézas, C. I. (2007). In Vitro and In Vivo Neurotoxicity of Prion Protein Oligomers. *PLOS Pathogens*, 3(8), e125. doi: 10.1371/journal.ppat.0030125
- Simonic, T., Duga, S., Strumbo, B., Asselta, R., Cecilian, F., & Ronchi, S. (2000). cDNA cloning of turtle prion protein. *FEBS Letters*, 469(1), 33-38. doi: 10.1016/S0014-5793(00)01232-1
- Simons, K., & Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1(1), 31-39.

- Smirnovas, V., Baron, G. S., Offerdahl, D. K., Raymond, G. J., Caughey, B., & Surewicz, W. K. (2011). Structural organization of brain-derived mammalian prions as probed by hydrogen exchange. *Nature structural & molecular biology*, *18*(4), 504-506. doi: 10.1038/nsmb.2035
- Solomon, I. H., Huettner, J. E., & Harris, D. A. (2010). Neurotoxic Mutants of the Prion Protein Induce Spontaneous Ionic Currents in Cultured Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(34), 26719-26726. doi: 10.1074/jbc.M110.134619
- Sonati, T., Reimann, R. R., Falsig, J., Baral, P. K., O'Connor, T., Hornemann, S., . . . Aguzzi, A. (2013). The toxicity of anti-prion antibodies is mediated by the flexible tail of the prion protein. *Nature*, *501*(7465), 102-106. doi: 10.1038/nature12402
- Sorce, S., Nuvolone, M., Keller, A., Falsig, J., Varol, A., Schwarz, P., . . . Aguzzi, A. (2014). The role of the NADPH oxidase NOX2 in prion pathogenesis. *PLoS Pathog*, *10*(12), e1004531. doi: 10.1371/journal.ppat.1004531
- Soto, C. Prion hypothesis: the end of the controversy? *Trends Biochem Sci*, *36*(3), 151-158. doi: 10.1016/j.tibs.2010.11.001
- Soto, C. (2011). Prion hypothesis: the end of the controversy? *Trends Biochem Sci*, *36*(3), 151-158. doi: 10.1016/j.tibs.2010.11.001
- Soto, C., Saborio, G. P., & Anderes, L. (2002). Cyclic amplification of protein misfolding: application to prion-related disorders and beyond. *Trends Neurosci*, *25*(8), 390-394. doi: S0166-2236(02)02195-1 [pii]
- Sparkes, R. S., Simon, M., Cohn, V. H., Fournier, R. E., Lem, J., Klisak, I., . . . Mohandas, T. (1986). Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *83*(19), 7358-7362.
- Speare, J. O., Offerdahl, D. K., Hasenkrug, A., Carmody, A. B., & Baron, G. S. (2010). GPI anchoring facilitates propagation and spread of misfolded Sup35 aggregates in mammalian cells. *The EMBO Journal*, *29*(4), 782-794. doi: 10.1038/emboj.2009.392
- Spevacek, A. R., Evans, E. G. B., Miller, J. L., Meyer, H. C., Pelton, J. G., & Millhauser, G. L. (2013). Zinc Drives a Tertiary Fold in the Prion Protein with Familial Disease Mutation Sites at the Interface. *Structure (London, England : 1993)*, *21*(2), 236-246. doi: 10.1016/j.str.2012.12.002
- Stahl, N., Baldwin, M. A., Teplow, D. B., Hood, L., Gibson, B. W., Burlingame, A. L., & Prusiner, S. B. (1993). Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry*, *32*(8), 1991-2002.
- Stahl, N., Borchelt, D. R., Hsiao, K., & Prusiner, S. B. (1987). Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell*, *51*(2), 229-240. doi: 10.1016/0092-8674(87)90150-4

- Steele, A. D., Lindquist, S., & Aguzzi, A. (2007). The prion protein knockout mouse: a phenotype under challenge. *Prion*, *1*(2), 83-93.
- Stevens, D. J., Walter, E. D., Rodríguez, A., Draper, D., Davies, P., Brown, D. R., & Millhauser, G. L. (2009). Early Onset Prion Disease from Octarepeat Expansion Correlates with Copper Binding Properties. *PLOS Pathogens*, *5*(4), e1000390. doi: 10.1371/journal.ppat.1000390
- Stöckel, J., Safar, J., Wallace, A. C., Cohen, F. E., & Prusiner, S. B. (1998). Prion Protein Selectively Binds Copper(II) Ions. *Biochemistry*, *37*(20), 7185-7193. doi: 10.1021/bi972827k
- Stöhr, J., Watts, J. C., Legname, G., Oehler, A., Lemus, A., Nguyen, H.-O. B., . . . Giles, K. (2011). Spontaneous generation of anchorless prions in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(52), 21223-21228. doi: 10.1073/pnas.1117827108
- Strumbo, B., Ronchi, S., Bolis, L. C., & Simonic, T. (2001). Molecular cloning of the cDNA coding for *Xenopus laevis* prion protein. *FEBS Letters*, *508*(2), 170-174.
- Sunyach, C., Jen, A., Deng, J., Fitzgerald, K. T., Frobert, Y., Grassi, J., . . . Morris, R. (2003). The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *The EMBO Journal*, *22*(14), 3591-3601. doi: 10.1093/emboj/cdg344
- Supattapone, S., Bosque, P., Muramoto, T., Wille, H., Aagaard, C., Peretz, D., . . . Scott, M. (1999). Prion Protein of 106 Residues Creates an Artificial Transmission Barrier for Prion Replication in Transgenic Mice. *Cell*, *96*(6), 869-878. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80596-6
- Supattapone, S., Muramoto, T., Legname, G., Mehlhorn, I., Cohen, F. E., DeArmond, S. J., . . . Scott, M. R. (2001). Identification of Two Prion Protein Regions That Modify Scrapie Incubation Time. *Journal of Virology*, *75*(3), 1408-1413. doi: 10.1128/JVI.75.3.1408-1413.2001
- Swietnicki, W., Petersen, R. B., Gambetti, P., & Surewicz, W. K. (1998). Familial Mutations and the Thermodynamic Stability of the Recombinant Human Prion Protein. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(47), 31048-31052. doi: 10.1074/jbc.273.47.31048
- Tagliavini, F., Lievens, P. M., Tranchant, C., Warter, J. M., Mohr, M., Giaccone, G., . . . Prelli, F. (2001). A 7-kDa prion protein (PrP) fragment, an integral component of the PrP region required for infectivity, is the major amyloid protein in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease A117V. *J Biol Chem*, *276*(8), 6009-6015. doi: 10.1074/jbc.M007062200M007062200 [pii]
- Tamgüney, G., Giles, K., Glidden, D. V., Lessard, P., Wille, H., Tremblay, P., . . . Prusiner, S. B. (2008). Genes contributing to prion pathogenesis. *The Journal of General Virology*, *89*(Pt 7), 1777-1788. doi: 10.1099/vir.0.2008/001255-0
- Tamgüney, G., Richt, J. A., Hamir, A. N., Greenlee, J. J., Miller, M. W., Wolfe, L. L., . . . Prusiner, S. B. (2012). Salivary prions in sheep and deer. *Prion*, *6*(1), 52-61. doi: 10.4161/pri.6.1.16984
- Tanaka, M., Collins, S. R., Toyama, B. H., & Weissman, J. S. (2006). The physical basis of how prion conformations determine strain phenotypes. *Nature*, *442*(7102), 585-589.

- Tanaka, M., Chien, P., Naber, N., Cooke, R., & Weissman, J. S. (2004). Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences. *Nature*, *428*(6980), 323-328.
- Taraboulos, A., Raeber, A. J., Borchelt, D. R., Serban, D., & Prusiner, S. B. (1992). Synthesis and trafficking of prion proteins in cultured cells. *Molecular Biology of the Cell*, *3*(8), 851-863.
- Taubner, L. M., Bienkiewicz, E. A., Copié, V., & Caughey, B. (2010). Structure of the flexible amino terminal domain of prion protein bound to a sulfated glycan. *Journal of Molecular Biology*, *395*(3), 475-490. doi: 10.1016/j.jmb.2009.10.075
- Taylor, D. R., & Hooper, N. M. (2006). The prion protein and lipid rafts (Review). *Molecular Membrane Biology*, *23*(1), 89-99. doi: 10.1080/09687860500449994
- Taylor, D. R., Watt, N. T., Perera, W. S. S., & Hooper, N. M. (2005). Assigning functions to distinct regions of the N-terminus of the prion protein that are involved in its copper-stimulated, clathrin-dependent endocytosis. *J Cell Sci*, *118*(21), 5141-5153. doi: 10.1242/jcs.02627
- Telling, G. C., Haga, T., Torchia, M., Tremblay, P., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (1996). Interactions between wild-type and mutant prion proteins modulate neurodegeneration in transgenic mice. *Genes Dev*, *10*(14), 1736-1750.
- Telling, G. C., Scott, M., Hsiao, K. K., Foster, D., Yang, S. L., Torchia, M., . . . Prusiner, S. B. (1994). Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from humans to transgenic mice expressing chimeric human-mouse prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, *91*(21), 9936-9940.
- Telling, G. C., Scott, M., Mastrianni, J., Gabizon, R., Torchia, M., Cohen, F. E., . . . Prusiner, S. B. (1995). Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell*, *83*(1), 79-90.
- Thackray, Alana M., Hopkins, L., & Bujdoso, R. (2007). Proteinase K-sensitive disease-associated ovine prion protein revealed by conformation-dependent immunoassay. *Biochemical Journal*, *401*(Pt 2), 475-483. doi: 10.1042/BJ20061264
- Thomzig, A., Schulz-Schaeffer, W., Wrede, A., Wemheuer, W., Brenig, B., Kratzel, C., . . . Beekes, M. (2007). Accumulation of Pathological Prion Protein PrP^{Sc} in the Skin of Animals with Experimental and Natural Scrapie. *PLOS Pathogens*, *3*(5), e66. doi: 10.1371/journal.ppat.0030066
- Timmes, A. G., Moore, R. A., Fischer, E. R., & Priola, S. A. (2013). Recombinant Prion Protein Refolded with Lipid and RNA Has the Biochemical Hallmarks of a Prion but Lacks In Vivo Infectivity. *PLoS One*, *8*(7), e71081. doi: 10.1371/journal.pone.0071081
- Tixador, P., Herzog, L., Reine, F., Jaumain, E., Chapuis, J., Le Dur, A., . . . Béringue, V. (2010). The Physical Relationship between Infectivity and Prion Protein Aggregates Is Strain-Dependent. *PLOS Pathogens*, *6*(4), e1000859. doi: 10.1371/journal.ppat.1000859

- Tobler, I., Gaus, S. E., Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rulicke, T., . . . Manson, J. C. (1996). Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature*, *380*(6575), 639-642.
- Torres, J.-M., Castilla, J., Pintado, B., Gutiérrez-Adan, A., Andréoletti, O., Aguilar-Calvo, P., . . . Espinosa, J.-C. (2013). Spontaneous Generation of Infectious Prion Disease in Transgenic Mice. *Emerging Infectious Diseases*, *19*(12), 1938-1947. doi: 10.3201/eid1912.130106
- Turnbaugh, J. A., Unterberger, U., Saá, P., Massignan, T., Fluharty, B. R., Bowman, F. P., . . . Harris, D. A. (2012). The N-Terminal, Polybasic Region of PrP(C) Dictates the Efficiency of Prion Propagation by Binding to PrP(Sc). *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *32*(26), 8817-8830. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1103-12.2012
- Turnbaugh, J. A., Westergard, L., Unterberger, U., Biasini, E., & Harris, D. A. (2011). The N-Terminal, Polybasic Region Is Critical for Prion Protein Neuroprotective Activity. *PLoS One*, *6*(9), e25675. doi: 10.1371/journal.pone.0025675
- Tuzi, N. L., Cancellotti, E., Baybutt, H., Blackford, L., Bradford, B., Plinston, C., . . . Manson, J. C. (2008). Host PrP glycosylation: a major factor determining the outcome of prion infection. *PLoS Biol*, *6*(4), e100. doi: 07-PLBI-RA-2655 [pii]10.1371/journal.pbio.0060100
- Um, J. W., Kaufman, A. C., Kostylev, M., Heiss, J. K., Stagi, M., Takahashi, H., . . . Strittmatter, S. M. (2013). Metabotropic Glutamate Receptor 5 is a Co-Receptor for Alzheimer A β Oligomer Bound to Cellular Prion Protein. *Neuron*, *79*(5), 887-902. doi: 10.1016/j.neuron.2013.06.036
- Van Keulen, L. J. M., Vromans, M. E. W., & Van Zijderveld, F. G. (2002). Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep. *APMIS*, *110*(1), 23-32. doi: 10.1034/j.1600-0463.2002.100104.x
- van Rheede, T., Smolenaars, M. M. W., Madsen, O., & de Jong, W. W. (2003). Molecular Evolution of the Mammalian Prion Protein. *Mol Biol Evol*, *20*(1), 111-121. doi: 10.1093/molbev/msg014
- Vázquez-Fernández, E., Vos, M. R., Afanasyev, P., Cebey, L., Sevillano, A. M., Vidal, E., . . . Wille, H. (2016). The Structural Architecture of an Infectious Mammalian Prion Using Electron Cryomicroscopy. *PLOS Pathogens*, *12*(9), e1005835. doi: 10.1371/journal.ppat.1005835
- Vella, L. J., Sharples, R. A., Lawson, V. A., Masters, C. L., Cappai, R., & Hill, A. F. (2007). Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing. *J Pathol*, *211*(5), 582-590. doi: 10.1002/path.2145
- Wadia, J. S., Schaller, M., Williamson, R. A., & Dowdy, S. F. (2008). Pathologic Prion Protein Infects Cells by Lipid-Raft Dependent Macropinocytosis. *PLoS One*, *3*(10), e3314. doi: 10.1371/journal.pone.0003314

- Wadsworth, J. D. F., Asante, E. A., Desbruslais, M., Linehan, J. M., Joiner, S., Gowland, I., . . . Collinge, J. (2004). Human Prion Protein with Valine 129 Prevents Expression of Variant CJD Phenotype. *Science*, *306*(5702), 1793-1796. doi: 10.1126/science.1103932
- WadsworthJonathan, D. F., HillAndrew, F., JoinerSusan, JacksonGraham, S., ClarkeAnthony, R., & CollingeJohn. (1999). Strain-specific prion-protein conformation determined by metal ions. *Nat Cell Biol*, *1*(1), 55-59.
- Walz, R., Amaral, O. B., Rockenbach, I. C., Roesler, R., Izquierdo, I., Cavalheiro, E. A., . . . Brentani, R. R. (1999). Increased Sensitivity to Seizures in Mice Lacking Cellular Prion Protein. *Epilepsia*, *40*(12), 1679-1682. doi: 10.1111/j.1528-1157.1999.tb01583.x
- Wang, F., Wang, X., & Ma, J. (2011). Conversion of bacterially expressed recombinant prion protein. *Methods*, *53*(3), 208-213. doi: S1046-2023(10)00296-3 [pii]10.1016/j.ymeth.2010.12.013
- Wang, F., Wang, X., Orrú, C. D., Groveman, B. R., Surewicz, K., Abskharon, R., . . . Ma, J. (2017). Self-propagating, protease-resistant, recombinant prion protein conformers with or without in vivo pathogenicity. *PLoS Pathogens*, *13*(7), e1006491. doi: 10.1371/journal.ppat.1006491
- Wang, F., Wang, X., Yuan, C.-G., & Ma, J. (2010). Generating a Prion with Bacterially Expressed Recombinant Prion Protein. *Science*, *327*(5969), 1132-1135. doi: 10.1126/science.1183748
- Warner, R. G., Hundt, C., Weiss, S., & Turnbull, J. E. (2002). Identification of the Heparan Sulfate Binding Sites in the Cellular Prion Protein. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(21), 18421-18430. doi: 10.1074/jbc.M110406200
- Watt, N. T., Taylor, D. R., Kerrigan, T. L., Griffiths, H. H., Rushworth, J. V., Whitehouse, I. J., & Hooper, N. M. (2012). Prion protein facilitates uptake of zinc into neuronal cells. *Nat Commun*, *3*, 1134. doi: 10.1038/ncomms2135
- Watts, J. C., Giles, K., Patel, S., Oehler, A., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (2014). Evidence That Bank Vole PrP Is a Universal Acceptor for Prions. *PLoS Pathogens*, *10*(4), e1003990. doi: 10.1371/journal.ppat.1003990
- Watts, J. C., Giles, K., Stöhr, J., Oehler, A., Bhardwaj, S., Grillo, S. K., . . . Prusiner, S. B. (2012). Spontaneous generation of rapidly transmissible prions in transgenic mice expressing wild-type bank vole prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(9), 3498-3503. doi: 10.1073/pnas.1121556109
- Weissmann, C. (1991). A 'unified theory' of prion propagation. *Nature*, *352*(6337), 679-683.
- Weissmann, C., & Aguzzi, A. (1997). Bovine spongiform encephalopathy and early onset variant Creutzfeldt—Jakob disease. *Current Opinion in Neurobiology*, *7*(5), 695-700.
- Weissmann, C., & Büeler, H. (2004). A mouse to remember. *Cell*, *116*, S111-S115. doi: 10.1016/S0092-8674(04)00032-7

- Weissmann, C., BüEler, H., Fischer, M., Sailer, A., Aguzzi, A., & Aguet, M. (1994). PrP-deficient Mice Are Resistant to Scrapie. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 724(1), 235-240. doi: 10.1111/j.1749-6632.1994.tb38913.x
- Wells, G., Scott, A., Johnson, C., Gunning, R., Hancock, R., Jeffrey, M., . . . Bradley, R. (1987). A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Veterinary Record*, 121(18), 419-420. doi: 10.1136/vr.121.18.419
- Westaway, D., DeArmond, S. J., Cayetano-Canlas, J., Groth, D., Foster, D., Yang, S. L., . . . Prusiner, S. B. (1994). Degeneration of skeletal muscle, peripheral nerves, and the central nervous system in transgenic mice overexpressing wild-type prion proteins. *Cell*, 76(1), 117-129. doi: 0092-8674(94)90177-5 [pii]
- Westergard, L., Christensen, H. M., & Harris, D. A. (2007). The cellular prion protein (PrPC): Its physiological function and role in disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1772(6), 629-644.
- Westergard, L., Turnbaugh, J. A., & Harris, D. A. (2011a). A Naturally Occurring C-terminal Fragment of the Prion Protein (PrP) Delays Disease and Acts as a Dominant-negative Inhibitor of PrP(Sc) Formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(51), 44234-44242. doi: 10.1074/jbc.M111.286195
- Westergard, L., Turnbaugh, J. A., & Harris, D. A. (2011b). A Nine Amino Acid Domain is Essential for Mutant Prion Protein Toxicity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(39), 14005-14017. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1243-11.2011
- Wilesmith, J. W., Wells, G. A., Cranwell, M. P., & Ryan, J. B. (1988). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet Rec*, 123(25), 638-644.
- Wilham, J. M., Orrú, C. D., Bessen, R. A., Atarashi, R., Sano, K., Race, B., . . . Caughey, B. (2010). Rapid End-Point Quantitation of Prion Seeding Activity with Sensitivity Comparable to Bioassays. *PLoS Pathogens*, 6(12), e1001217. doi: 10.1371/journal.ppat.1001217
- Wille, H., Bian, W., McDonald, M., Kendall, A., Colby, D. W., Bloch, L., . . . Stubbs, G. (2009). Natural and synthetic prion structure from X-ray fiber diffraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(40), 16990-16995. doi: 10.1073/pnas.0909006106
- Williams, A. E., Lawson, L. J., Perry, V. H., & Fraser, H. (1994). Characterization of the microglial response in murine scrapie. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 20(1), 47-55. doi: 10.1111/j.1365-2990.1994.tb00956.x
- Williams, E. S., & Young, S. (1980). Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J Wildl Dis*, 16(1), 89-98.

- Windl, O., Buchholz, M., Neubauer, A., Schulz-Schaeffer, W., Groschup, M., Walter, S., . . . Kretzschmar, H. A. (2005). Breaking an absolute species barrier: transgenic mice expressing the mink PrP gene are susceptible to transmissible mink encephalopathy. *J Virol*, *79*(23), 14971-14975. doi: 10.1128/JVI.79.23.14971-14975.2005
- Wong, C. n., Xiong, L.-W., Horiuchi, M., Raymond, L., Wehrly, K., Chesebro, B., & Caughey, B. (2001). Sulfated glycans and elevated temperature stimulate PrP(Sc)-dependent cell-free formation of protease-resistant prion protein. *The EMBO Journal*, *20*(3), 377-386. doi: 10.1093/emboj/20.3.377
- Wu, B., McDonald, A. J., Markham, K., Rich, C. B., McHugh, K. P., Tatzelt, J., . . . Harris, D. A. (2017). The N-terminus of the prion protein is a toxic effector regulated by the C-terminus. *Elife*, *6*, e23473. doi: 10.7554/eLife.23473
- Wyatt, J., Pearson, G., Smerdon, T., Gruffydd-Jones, T., Wells, G., & Wilesmith, J. (1991). Naturally occurring scrapie-like spongiform encephalopathy in five domestic cats. *Veterinary Record*, *129*(11), 233-236. doi: 10.1136/vr.129.11.233
- Wyatt, J. M., Pearson, G. R., Smerdon, T. N., Gruffydd-Jones, T. J., Wells, G. A., & Wilesmith, J. W. (1991). Naturally occurring scrapie-like spongiform encephalopathy in five domestic cats. *Vet Rec*, *129*(11), 233-236.
- Yang, W., Cook, J., Rassbach, B., Lemus, A., DeArmond, S. J., & Mastrianni, J. A. (2009). A New Transgenic Mouse Model of Gerstmann-Straussler-Scheinker Syndrome Caused by the A117V Mutation of PRNP. *J Neurosci*, *29*(32), 10072-10080. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2542-09.2009 [pii]
- Yin, S., Yu, S., Li, C., Wong, P., Chang, B., Xiao, F., . . . Sy, M.-S. (2006). Prion Proteins with Insertion Mutations Have Altered N-terminal Conformation and Increased Ligand Binding Activity and Are More Susceptible to Oxidative Attack. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(16), 10698-10705. doi: 10.1074/jbc.M511819200
- You, H., Tsutsui, S., Hameed, S., Kannanayakal, T. J., Chen, L., Xia, P., . . . Zamponi, G. W. (2012). A β neurotoxicity depends on interactions between copper ions, prion protein, and N-methyl-d-aspartate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(5), 1737-1742. doi: 10.1073/pnas.1110789109
- Yuan, J., Zhan, Y.-A., Abskharon, R., Xiao, X., Martinez, M. C., Zhou, X., . . . Zou, W.-Q. (2013). Recombinant Human Prion Protein Inhibits Prion Propagation in vitro. *Scientific Reports*, *3*, 2911. doi: 10.1038/srep02911
- Zahn, R. (2003). The Octapeptide Repeats in Mammalian Prion Protein Constitute a pH-dependent Folding and Aggregation Site. *Journal of Molecular Biology*, *334*(3), 477-488.

- Zhang, C. C., Steele, A. D., Lindquist, S., & Lodish, H. F. (2006). Prion protein is expressed on long-term repopulating hematopoietic stem cells and is important for their self-renewal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(7), 2184-2189. doi: 10.1073/pnas.0510577103
- Zhang, Y., Swietnicki, W., Zagorski, M. G., Surewicz, W. K., & Sönnichsen, F. D. (2000). Solution Structure of the E200K Variant of Human Prion Protein: IMPLICATIONS FOR THE MECHANISM OF PATHOGENESIS IN FAMILIAL PRION DISEASES. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(43), 33650-33654. doi: 10.1074/jbc.C000483200
- Zou, W.-Q., Capellari, S., Parchi, P., Sy, M.-S., Gambetti, P., & Chen, S. G. (2003). Identification of Novel Proteinase K-resistant C-terminal Fragments of PrP in Creutzfeldt-Jakob Disease. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(42), 40429-40436. doi: 10.1074/jbc.M308550200
- Zou, W. Q., Puoti, G., Xiao, X., Yuan, J., Qing, L., Cali, I., . . . Gambetti, P. (2010). Variably protease-sensitive prionopathy: a new sporadic disease of the prion protein. *Ann Neurol*, *68*(2), 162-172. doi: 10.1002/ana.22094

