

Estudio de la diversidad y estabilidad de
diferentes priones recombinantes infecciosos
para dilucidar los mecanismos moleculares que
rigen el fenómeno de cepa

Rafael López Moreno

Leioa, 2021

ABREVIATURAS

- μg : microgramo
- μl : microlitro
- μm : micrómetro
- nm: nanómetro
- Ω : ohmios
- $^{\circ}\text{C}$: grado centígrado
- 12B2: anticuerpo monoclonal anti-PrP denominado 12B2
- 22L: cepa priónica de *scrapie* adaptado a ratón
- 301C: cepa priónica de BSE adaptada a ratón
- 3F4: anticuerpo monoclonal anti-PrP denominado 3F4
- 6C2: anticuerpo monoclonal anti-PrP denominado 6C2

A

- AFM: del inglés, *atomic force microscopy*
- ASO: oligonucleótido antisentido, del inglés, *Antisense Oligonucleotide*

B

- Bar 224: anticuerpo monoclonal anti-PrP denominado Bar 224
- BSE: del inglés, *Bovine Spongiform Encephalopathy*

C

- CC: del inglés, *charged cluster*
- CD: del inglés, *Circular Dichroism*
- CD1: modelo animal de genotipo silvestre
- CEP: en inglés, *Congenital Erythropoietic Porphyria*
- CJD: del inglés, *Creutzfeldt-Jakob Disease*
- cm: centímetro
- CMV: cytomegalovirus
- compB: compuesto inhibidor, del inglés, *compound B*,
- cryoEM: criomicroscopía electrónica
- C-terminal: extremo carboxilo terminal
- CWD: del inglés, *Chronic Wasting Disease*

D

- D₂O: agua deuterada

- Da: dalton
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- DNAsa: deoxirribonucleasa
- dNTP: del inglés, *deoxynucleotide triphosphates*
- DO₆₀₀: densidad óptica a 600nm
- DMEM: del inglés, *Dulbecco's Modified Eagle medium*
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- DY: *Drowsy*, cepa de prion de hámster

E

- *E. coli*: *Escherichia coli*,
- EDTA: etilendiaminotetraacético
- EET: encefalopatía espongiiforme transmisible
- EGCG: del inglés, *epigallocatechin Gallate*

F

- F: del inglés, *forward*
- FBS: del inglés, *fetal bovine serum*
- FFI: del inglés, *fatal familial insomnia*
- FSE: del inglés, *feline spongiform encephalopathy*
- FTIR: del inglés, *fourier transform infrared spectroscopy*

G

- *g*: fuerza centrífuga relativa
- GADD34: del inglés *growth arrest and DNA damage-inducible 34*
- gCJD: del inglés, *genetic Creutzfeldt-Jakob Disease*
- GPI: del inglés, *glycosylphosphatidylinositol*
- GSS: *Gerstmann-Sträussler-Scheinker*
- GFAP: del inglés, *Glial Fibrillary Acidic Protein*
- Gdn-HCl: hidrocloreuro de guanidinio

H

- h: hora
- HC: del inglés, *hydrofobic core*
- HE: heterocigoto
- HO: homocigoto
- HPLC: del inglés, *high performance liquid chromatography*
- HPLC/FL: del inglés *high performance liquid chromatography- Fluorimetric Detector*

- HXMS: del inglés, *hydrogen–deuterium exchange mass spectrometry*
- HY: *Hyper*, cepa de prión de hámster

I

- IC50: del inglés, *half maximal inhibitory concentration*
- iCJD: del inglés, *iatrogenic Creutzfeldt-Jakob Disease*
- ICSM: anticuerpo monoclonal anti-PrP denominado ICSM
- IF2 α : del inglés, *eukaryotic translation initiation factor 2*
- IHQ: inmunohistoquímica
- IMDM: del inglés, *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*
- IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopirósido
- ISR: del inglés, *integrated stress response*
- ISRIB: compuesto que inhibe la ISR
- ITC: del inglés, *isothermal titration calorimetry*

K

- kDa: kilodalton
- Kd: Constante de afinidad
- KO: animal transgénico que no expresa un determinado gen
- KO-PrP: animal transgénico que no expresa el gen que codifica la PrP

L

- LB: Luria Bertoni, medio de cultivo de bacterias
- LCP: del inglés, *Luminiscent Conjugated Polythiophenes*

M

- M: molar
- MD: del inglés, *Molecular Dynamics*
- mg: miligramo
- min: minuto
- ml: mililitro
- mm: milímetro
- mM: milimolar
- MTT: bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolio

N

- ng: nanogramo
- nm: nanómetro
- N-terminal: extremo amino terminal

- Nor98: cepa de prion ovino atípica
- N2a: línea celular de neuroblastoma de ratón

O

- OPRI: del inglés, *octapeptide repeat insertions*
- ORF: marco de lectura abierto, del inglés, *open reading frame*
- OR: octarrepeticiones, del inglés, *octapeptide repeats*

P

- p/v: peso/volumen
- PBS: del inglés, *phosphate buffered saline*
- PCR: del inglés, *polymerase chain reaction*
- PDB: del inglés. *Protein Data Bank*
- Pe: permeabilidad endotelial
- PERK: del inglés, *PKR-like endoplasmic reticulum kinase*
- PIRIBS: modelo de hoja- β paralela en registro
- PK: proteinasa K
- PM: marcador de peso molecular
- PMCA: del inglés, *Protein Misfolding Cyclic Amplification*
- PMSA: del inglés, *Protein Misfolding Shaking Amplification*
- PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- PPS: del inglés, pentosan polysulfate
- PRN100: anticuerpo monoclonal humanizado anti-PrP^C denominado PRN100
- *PRNP*: gen que codifica la proteína PrP
- *PRNP*^{-/-}: animal transgénico KO para el gen que codifica la proteína PrP
- *PRNP*^{+/-}: animal transgénico hemicigoto para el gen que codifica la proteína PrP
- *PRNP*^{+/+}: animal transgénico homocigoto para el gen que codifica la proteína PrP
- PrP: proteína del prion, del inglés, *Prion protein*
- PrP*: PrP en un estado conformacional transitorio, intermedio entre PrP^C y PrP^{Sc}
- PrP²⁷⁻³⁰: PrP resistente a PK de 27-30 kDa
- PrP^C: isoforma celular de PrP, del inglés, *cellular prion protein*
- PrP^{Pres}: PrP resistente a la digestión con PK
- PrP^{Sc}: isoforma patógena de PrP, del inglés, *Scrapie associated Prion Protein*
- PTA: del inglés, *phosphotungstic acid*
- PVDF: polifluoruro de vinilideno

Q

- QUIC: del inglés, *quaking induced conversion*

R

- R: del inglés, *reverse*
- RE: retículo endoplasmático
- recPrP: PrP recombinante
- RML: cepa de prion ovino adaptado a ratón en el *Rocky Mountain Laboratory*
- RNA: ácido ribonucleico
- RNAi: ácido ribonucleico de interferencia
- RNAm: ácido ribonucleico mensajero
- rpm: revoluciones por minuto
- RMN: resonancia magnética nuclear
- RT-QuIC: del inglés, *Real Time - Quaking Induced Conversion*

S

- s: segundo
- SAF: del inglés, *scrapie associated fibrils*
- Saf 83: anticuerpo monoclonal anti-PrP denominado Saf 83
- sCJD: del inglés, *sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease*
- SD: del inglés, *standard deviation*
- SDS-PAGE: del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
- sFI: del inglés, *sporadic fatal insomnia*
- Sha 31: anticuerpo monoclonal anti-PrP denominado Sha 31
- SNC: sistema nervioso central
- SPR: del inglés, *surface plasmon resonance*

T

- Tris-HCl: tris(hidroximetil)aminometano hidrocloreuro
- TEER: del inglés, *transendothelial electrical resistance*
- TEM: microscopía electrónica de transmisión, del inglés, *transmission electron microscopy*
- ThT: del inglés, *Thioflavine T*
- TME: del inglés, Transmissible Mink Encephalopathy
- TMPyP-Fe(III): del inglés, *Iron (III) meso-Tetra(N-methyl-4-pyridyl)porphine*

U

- UROIII: enzima uroporfirinógeno III sintasa
- URO I: uroporfirina I
- UPR: del inglés, *unfolded protein response*

- UPS: del inglés, *ubiquitin proteasome system*
- UV: radiación ultravioleta

V

- v/v: volumen/volumen
- vCJD: del inglés, *variant Creutzfeldt-Jakob Disease*
- VPSP: del inglés, *Variably Protease-Sensitive Prionopathy*

W

- 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

ÍNDICE	7
RESUMEN	11
SUMMARY	13
INTRODUCCIÓN.....	15
1. Encefalopatías espongiformes transmisibles.....	15
2. Historia de las enfermedades priónicas	17
2.1 Primeros casos.....	17
2.2 Teoría virus lento	18
2.3 Teoría solo proteína	19
2.4 Refutación de la teoría de solo proteína: modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	21
3. Agente etiológico causante de las enfermedades priónicas	22
3.1 Pr ^{PC}	22
3.2 Malplegamiento y formación de agregados proteicos	27
3.3 Efectos sistémicos del cambio conformacional: neurotoxicidad	33
4. Fenómeno de cepas priónicas.....	35
4.1 Caracterización de las cepas priónicas	36
4.2 Propiedades de las cepas priónicas <i>in vivo</i>	38
4.3 Efecto de los cofactores en la formación y selección de cepas priónicas	40
4.4 Efecto de los polimorfismos en la propagación de cepas priónicas.....	42
4.5 Cepas atípicas.....	44
4.6 Importancia del fenómeno de cepas priónicas: barrera de transmisión.....	45
4.7 Mezcla de cepas priónicas: cuasiespecies y el modelo de cambio conformacional	47
5. Estudio de propagación de cepas priónicas <i>in vitro</i> : sistemas de propagación de priones....	48

5.1 Sistemas de propagación <i>in cellula</i>	48
5.2 Ensayo de conversión libre de células	49
5.3 PMCA.....	49
5.4 Conversión inducida por agitación o QuIC.....	51
5.5 PMSA	52
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	54
MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
1. Construcción de plásmidos de expresión de las PrP utilizadas	55
1.1 Generación de los plásmidos con PrP de topillo rojo 109I, ratón y oveja 112I	55
1.2 Generación de los plásmidos con PrP de topillo rojo 109M, 109L, 109A, 109V, 109F, 112M y 109M 112M, y oveja ARQ 112I.....	57
2. Obtención de proteínas recombinantes	60
2.1 Transformación de bacterias <i>E. coli Rosetta (DE3)TM</i>	60
2.2 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes	60
3. Propagación y generación de proteínas malplegadas <i>in vitro</i> mediante PMSA.....	62
3.1 Preparación de sustratos para PMSA	62
3.2 Generación espontánea de proteínas malplegadas en PMSA	63
3.3 Propagación de proteínas malplegadas en PMSA	63
3.4 Adsorción de PrP malplegada a partículas esféricas para su posterior propagación en PMSA	64
3.4 Modificación de proteínas malplegadas en PMSA alterando la composición del sustrato base	64
4. Detección de PrP malplegada.....	65
4.1 Digestión de PrP malplegada con proteinasa K	65
4.2 Detección de proteínas mediante electroforesis desnaturizante y tinción de proteína total	66
5. Caracterización biológica de las PrP malplegadas obtenidas <i>in vitro</i>	66

5.1 Inoculación del modelo murino TgVole.....	66
5.2 Estudio histopatológico	68
5.3 Detección de PrP ^{Sc} en encéfalo	68
6. Caracterización bioquímica de las PrP malplegadas	69
6.1 Capacidad de propagación in vitro a expensas de PrP de topillo rojo con mutaciones puntuales y PrP de otras especies	69
6.2 Detección de estructuras fibrilares mediante microscopía electrónica.....	70
6.3 Análisis de similitud	71
RESULTADOS.....	72
1. Obtención de diferentes PrP recombinantes malplegadas de topillo rojo 109I.....	72
1.1 Generación espontánea PrP recombinantes malplegadas en PMSA	72
1.2 Adaptación de priones de topillo rojo inoculados con CWD a PMSA	73
1.3 Análisis mediante microscopía electrónica de transmisión y tinción negativa.....	75
2. Caracterización biológica preliminar de las cepas seleccionadas mediante la inoculación intracerebral en TgVole (1x).....	76
3. Generación de un panel de pruebas bioquímicas que permitan caracterizar <i>in vitro</i> las diferentes cepas priónicas	78
3.1 Evaluación de la capacidad propagativa de las distintas cepas recombinantes a expensas de PrP recombinante de topillo rojo con mutaciones puntuales	80
3.2 Evaluación de la capacidad propagativa de las distintas cepas recombinantes a expensas de PrP recombinante de otras especies	81
4. Aplicación del panel de pruebas bioquímicas a un nuevo grupo de PrP recombinantes malplegadas para su caracterización y clasificación.....	82
4.1 Generación de PrP recombinantes malplegadas diferente origen mediante cambios en el entorno de propagación.....	82
4.2 Análisis mediante microscopía electrónica de transmisión y tinción negativa.....	84
4.3 Caracterización bioquímica de las nuevas PrP malplegadas seleccionadas	85
5. Análisis cuantitativo de la variedad de cepas generadas.....	86

6. Modificación de cepas priónicas mediante alteraciones en el entorno de propagación <i>in vitro</i>	88
6.1 Efecto de la presencia de agentes caotrópicos en el entorno de propagación como inductor de alteraciones en las propiedades de las cepas priónicas	89
6.2 Efecto de la pérdida de cofactor en las propiedades de las cepas priónicas.....	98
7. Análisis de la diversidad de semillas obtenidas y del efecto de su propagación en distintos entornos en las características de cepa.....	103
DISCUSIÓN	106
CONCLUSIONES	123
BIBLIOGRAFÍA	124

RESUMEN

Los priones son los agentes infecciosos causantes de las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET), un conjunto de enfermedades neurodegenerativas mortales que se caracterizan por largos períodos de incubación. La teoría más aceptada propone que la PrP^{Sc} (isoforma patogénica de la proteína priónica celular, PrP^C) es el único agente causal de estas enfermedades. PrP^C y PrP^{Sc} no difieren en la secuencia aminoacídica, sino en su estructura, y son estos cambios conformacionales los responsables de las diferentes propiedades bioquímicas y biológicas: la PrP^C es soluble y sensible a proteasas, mientras que la PrP^{Sc} es insoluble y parcialmente resistente a la digestión proteolítica; además, la PrP^{Sc} pero no la PrP^C presenta capacidad neurotóxica. En la naturaleza, los priones surgen en forma de diferentes cepas con propiedades biológicas y bioquímicas diferentes. Aunque las diferentes cepas pueden contener la misma secuencia de aminoácidos, sus propiedades distintivas son atribuidas a conformaciones espaciales diferentes. Sin embargo, los mecanismos moleculares que subyacen a la formación y mantenimiento de las características de cepa son aún poco conocidos.

En esta tesis, se han generado haciendo uso de la metodología PMSA y analizado bioquímica y biológicamente un conjunto de cepas priónicas diferentes utilizando como modelo la PrP recombinante de topillo rojo (*Myodes glareolus*, Bank vole en inglés). Primero, se generaron un conjunto de semillas potencialmente distintas dado su origen (malplegamiento espontáneo o dirigido por la adición de semillas derivadas de priones de cérvidos, CWD) y su patrón de movilidad electroforética, utilizando dextrano sulfatado como cofactor. Estas semillas formaban fibras distinguibles mediante microscopía electrónica y presentaron diferentes propiedades *in vivo* cuando se inocularon en el modelo de ratón transgénico TgVole (1x). Para su caracterización bioquímica, se analizó su capacidad para malplegar a expensas de PrP no homólogas, basadas en mutantes en las posiciones 109 y 112 y en proteína recombinante de otras especies (ratón y oveja). Las diferencias observadas en sus propiedades bioquímicas permitieron una clasificación y diferenciación rápida de las semillas generadas, así como analizar posibles cambios debidos a alteraciones en el entorno de propagación. Estas alteraciones se abordaron desde dos vías diferentes: mediante la eliminación del cofactor y mediante la adición de un agente caotrópico (urea). Las semillas resultantes tras la propagación en estos sustratos alterados fueron caracterizadas bioquímica y biológicamente, revelando diferencias con las semillas originales y entre ellas. Sin embargo, el proceso de modificación resultaba en una pérdida de la diversidad original.

En conjunto, se obtuvieron 17 semillas diferenciables entre sí basadas en la caracterización bioquímica realizada. Las características más importantes para permitir la diferenciación entre las cepas son el patrón de movilidad electroforética (según presenten o no las bandas de ~16 kDa, ~11 kDa y ~6 kDa) y su capacidad para malplegar las proteínas de topillo rojo con las mutaciones 109M y 109L, así como las proteínas no homólogas de ratón y oveja.

Por todo ello, el sistema de caracterización bioquímica desarrollado en esta tesis permite la clasificación de la diversidad de cepas según las propiedades mostradas *in vitro*, lo que podría correlacionarse con sus propiedades biológicas, permitiendo en un futuro la predicción de sus fenotipos esperados *in vivo*.

SUMMARY

Prions are the infectious agents responsible for transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), a group of invariably fatal neurodegenerative disorders characterized by long incubation periods. The most accepted hypothesis proposes that PrP^{Sc} (pathogenic isoform of the cellular prion protein, PrP^C) is the sole component of the infectious agent. PrP^C and PrP^{Sc} despite their identical amino acid sequence, differ in their conformation, and these structural changes modify their biochemical and biological properties: PrP^C is soluble and highly susceptible to proteases, PrP^{Sc} is insoluble and partially resistant to cleavage; moreover, PrP^{Sc} but not PrP^C is highly neurotoxic. In nature, prions occur in the form of different strains that show distinct biological and physicochemical properties, even though they are encoded by proteins containing the same amino acid sequence, albeit in presumably different conformations. However, the molecular mechanisms that underlie the prion strain formation and feature maintenance are still poorly understood.

In this thesis, we generated a group of different recombinant misfolded prion proteins *in vitro* using PMSA, a prion propagation methodology and analysed them biochemically and biologically. First, we generated using recombinant bank vole (*Myodes glareolus*) PrP, potentially different prion seeds based on their origin (spontaneous misfolding or seeded with CWD prions) and their electrophoretic pattern, with sulphated dextran as cofactor. Those seeds were able to form distinguishable fibrils visualized by electron microscopy, and showed different properties *in vivo* when inoculated in TgVole (1x) transgenic mice. For their biochemical characterization, we analysed their differential capacity to misfold non-homologous PrP substrates, based on variations in positions 109, 112 and recombinant mouse and sheep PrP. Differences in their biochemical properties allowed us to classify and differentiate easily all the strains originally generated, as well as analyse changes due to modifications in the chemical propagation environment. Those modifications were induced by the elimination of the cofactor and through the addition of a chaotropic agent (urea). The resultant seeds after propagation in those altered substrates were biochemically characterised, revealing differences with the original strains and among them. However, the modification process resulted in a loss of the original diversity.

In total, we obtained 17 distinguishable seeds based on their biochemical characterization. The most important features that allow us to differentiate among these strains are the electrophoretic pattern (presence or absence of the ~16 kDa, ~11 kDa and ~6 kDa bands) and their capacity to misfold the mutant vole proteins 109M and 109L, as well as the mouse and sheep PrP.

Altogether, the biochemical characterization system developed in this thesis allows the classification of the diversity of existing seeds according to the properties shown *in vitro*, which could be correlated with their respective biological properties, allowing in the near future the prediction of the expected phenotypes for each group of seeds.

INTRODUCCIÓN

1. Encefalopatías espongiformes transmisibles

Las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EET) son un conjunto de enfermedades neurodegenerativas raras, mortales y transmisibles que afectan a diferentes grupos de mamíferos, entre los que se encuentra el ser humano (1). Entre las EET descritas en animales destacan por su relevancia socioeconómica el *scrapie* o tembladera, que afecta al ganado ovino y caprino, la Encefalopatía Espongiforme Bovina (BSE por sus siglas en inglés, *Bovine Spongiform Encephalopathy*) o “mal de las vacas locas”, causante de la epidemia por carne contaminada durante los años 90, y la Enfermedad Debilitante Crónica de Cérvidos (CWD por sus siglas en inglés, *Chronic Wasting Disease*), que está cobrando especial relevancia en la actualidad debido al creciente número de casos en Estados Unidos y Canadá causados por una alta tasa de transmisión a través de orina y heces de animales enfermos y a la aparición reciente de los primeros casos en el norte de Europa. Al igual que en otros mamíferos, se han descrito diferentes enfermedades priónicas en el ser humano como la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD, del inglés, *Creutzfeldt-Jakob Disease*), la enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), el Insomnio Familiar Letal o Fatal (FFI, del inglés *Fatal Familial Insomnia*), el Kuru y la Prionopatía con Sensibilidad Variable a Proteasas (VPSPr, del inglés *Variable Protease-Sensitive Prionopathy*) (2).

Las EET se caracterizan por presentar largos períodos de incubación (que pueden ir desde meses hasta décadas) seguidos de la aparición de signos neurológicos como alteraciones en el comportamiento, ataxia cerebelar, y una disfunción progresiva tanto a nivel motor como cognitivo entre otros. Debido a la ausencia a día de hoy de tratamiento (ya sea curativo o profiláctico), las EET son letales en todos los casos, caracterizadas por una rápida progresión de la neurodegeneración desde la aparición de los primeros signos. Debido a la gran variabilidad de signos y a que muchos son comunes a otras enfermedades neurodegenerativas más prevalentes, el diagnóstico definitivo suele requerir un estudio *post mortem* del encéfalo. A nivel histopatológico, el cerebro muestra alteraciones típicas de una glía activa a nivel del sistema nervioso central (astrogliosis), la aparición de vacuolas (espongiosis) debido a la muerte neuronal característica de este tipo de enfermedades neurodegenerativas, y depósitos de proteína malplegada (Figura 1) (3).

El diagnóstico definitivo en la gran mayoría de casos, pasa por la detección de depósitos de determinada proteína malplegada en el encéfalo, siendo el marcador patognomónico de este tipo de enfermedades. Esto se debe a que las EET están causadas por el malplegamiento de una proteína endógena conocida como proteína del prion celular (PrP^C). El cambio conformacional genera una

INTRODUCCIÓN

isoforma de esta proteína, que se denomina PrP^{Sc} (de *scrapie*) con alta tendencia a agregarse, insoluble, y resistente a la desnaturalización por calor o productos químicos y a la digestión mediante proteasas (4, 5).

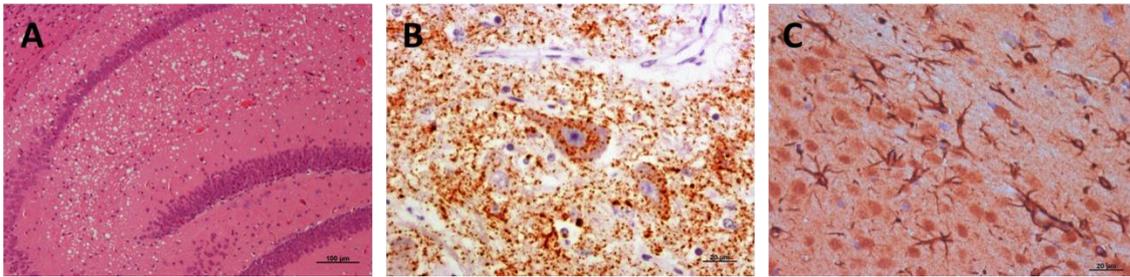


Figura 1. Anomalías histopatológicas observables en los encéfalos de animales afectados por una enfermedad priónica. A) Imagen del hipocampo de un ratón con scrapie donde se aprecian las vacuolas características del daño espongiforme. Tinción con hematoxilina & eosina. B) Depósitos de PrP en médula oblongada de una oveja con scrapie. Tinción con anticuerpo anti-PrP L42. C) Aumento de gliosis reactiva en la corteza de un ratón con scrapie. Tinción con anticuerpo anti-Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP). (Modificado de Barrio 2019).

Las diferentes EET, pese a la elevada variedad de manifestaciones clínicas con la que pueden presentarse, tienen un agente etiológico común, el prion, cuyo origen puede diferir. Es por esto por lo que se pueden diferenciar entre EET genéticas, adquiridas y esporádicas

- **EET genéticas:** también llamadas hereditarias o familiares, representan el 10-15 % de los casos. Están relacionadas con mutaciones autosómicas dominantes en el gen de la PrP (*PRNP*) (6). Entre las EET humanas descritas se encuentran el CJD genético, el FFI y el GSS. En la actualidad hay más de 60 mutaciones asociadas con el desarrollo de alguna EET (7).
- **EET adquiridas:** relacionadas con la introducción exógena del agente infeccioso, ya sea por prácticas médicas (origen iatrogénico) o por la ingestión de material contaminado. Se han descrito varios casos de transmisión iatrogénica causados por trasplante de córnea (8), de duramadre o del tratamiento con hormona de crecimiento proveniente de cadáveres infectados (9, 10). Por ingestión de material contaminado, destaca el Kuru, relacionado con rituales caníbales (11), y la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vCJD), originada por la ingesta de carne bovina contaminada con priones causantes de BSE. Esta zoonosis fue descrita por primera vez en 1996 (12).
- **EET esporádicas:** representan el tipo de EET más común en humanos, ya que suponen aproximadamente el 85 % de los casos diagnosticados. Estas enfermedades parecen ocurrir de manera espontánea, sin una causa desencadenante conocida. En humanos se han descrito el CJD esporádico, el insomnio letal esporádico y el VPSPr. Ninguna de estas enfermedades ha podido relacionarse con ninguna alteración genética o factor de riesgo (10). El posible origen zoonótico de estas enfermedades no presenta

evidencias, ya que los estudios epidemiológicos realizados (13, 14) descartan el origen exógeno. La hipótesis más aceptada sugiere que estas enfermedades aparecen como resultado de una conversión espontánea de la PrP^C a la PrP^{Sc}, un fenómeno que tendría una frecuencia extremadamente baja (10) y cuyos mecanismos subyacentes aún se están estudiando gracias a nuevos modelos *in vivo* e *in vitro*.

La inusual naturaleza del patógeno causante de las EET, hizo que durante décadas éstas fuesen atribuidas a la acción de un virus lento que afectaba el sistema nervioso central (SNC) dada su transmisibilidad entre individuos. Sin embargo, a lo largo de años de investigación fueron reuniéndose evidencias que finalmente descartaron esta posibilidad, relacionando las EET con el primer agente infeccioso descrito de naturaleza exclusivamente proteica.

2. Historia de las enfermedades priónicas

2.1 Primeros casos

La primera referencia a las EET de la que se tiene constancia data del siglo XVIII, cuando los ganaderos de Lincolnshire atribuyeron un brote de tembladera o *scrapie* a la importación de oveja merina desde España, y solicitaban al Parlamento inglés un mayor control al respecto. A partir de este primer escrito, quedan registrados otros textos de diferente naturaleza que tratan de relacionar el *scrapie* (única enfermedad priónica conocida en esa época) con diferentes causas, tan dispares como un exceso de actividad sexual del ganado o las tormentas eléctricas (15).

A finales del siglo XIX, Besnoit propuso que el agente causal de la enfermedad debía ser un “agente filtrable” de naturaleza vírica, aunque también llegó a relacionarse con el parásito *Sarcosporidium* (16). Estas primeras hipótesis llevaron a demostrar la transmisibilidad de la enfermedad a finales de los años 30 por Cullie y Chelle que pudieron causar la enfermedad en ovejas sanas mediante inoculación de tejido nervioso de ejemplares afectados (17). Esto fue más tarde refutado por William Gordon con un mayor número de animales en el Instituto Moredun de Edimburgo, aunque la ausencia de inactivación del patógeno por la formalina con la que estaban fijados los cerebros utilizados como inóculo, hacía dudar de la naturaleza vírica del agente causal (15). La investigación se vería interrumpida debido a la Segunda Guerra Mundial, y no se retomaría hasta años más tarde, cuando se demostró que la transmisión interespecie, esta vez de oveja a ratones, era posible (18).

De manera paralela a los descubrimientos realizados con las EET ovinas y caprinas, los neurólogos Hans Gerhard Creutzfeldt y Adolf Jakob describieron en los años 20 los primeros casos de una enfermedad neurodegenerativa en humanos (19, 20) que sería nombrada más tarde en su honor: enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD). Sería la primera EET descrita en humanos, aunque

INTRODUCCIÓN

aparecería en la literatura con diferentes nombres debido a la variabilidad de síntomas y signos de los pacientes, y tardaría aún años en relacionarse con otras enfermedades priónicas, tanto humanas como de otros animales.

Los mayores avances en la materia no se darían hasta finales de los años 50 y principios de los 60, cuando el doctor Vincent Zigas describió una nueva encefalitis en los Fore, un grupo étnico de Papúa Nueva Guinea. Entre los nativos, esta enfermedad era conocida como “Kuru”, que significa temblor o miedo en su idioma, en referencia a los temblores característicos que causaba. Acompañando a estos temblores, aparecían graves problemas motores que culminaban con la pérdida total de la capacidad para andar o mantenerse en pie y, finalmente, la muerte de todos los afectados (11). Unos años más tarde el pediatra Carleton Gajdusek atribuyó el Kuru a un virus lento que afectaba al sistema nervioso y lo relacionó con las prácticas caníbales de la tribu: cuando un hombre moría, el resto se alimentaban de su carne para liberar su espíritu, según las creencias de los Fore. Uno de los puntos clave de esta ceremonia era el consumo del cerebro por parte de la mujer y los hijos del fallecido, lo que podría explicar la mayor incidencia en mujeres y niños de la tribu. Así quedó vinculado el Kuru y su transmisión con el consumo del encéfalo y la médula espinal donde debía encontrarse el agente infeccioso (21).

2.2 Teoría virus lento

Pese a que durante años se intentó aislar el patógeno (un virus según las teorías de aquella época), todos los esfuerzos realizados por Gajdusek y colaboradores fueron en vano, por lo que la posible relación del Kuru con la enfermedad más similar descrita hasta la fecha, el CJD, observación realizada por Igor Klatzo en 1957, no pudo ser demostrada en ese momento (22). Pocos años más tarde, sería el patólogo William Hadlow quien volvería a relacionar el Kuru con la única otra EET descrita hasta el momento, el *scrapie*, por el parecido en el patrón de lesiones histopatológicas de encéfalos afectados (23). El propio Hadlow conseguiría demostrar la transmisibilidad del Kuru utilizando macacos basándose en la transmisibilidad del *scrapie* entre ovejas, y más tarde Gajdusek y Gibbs la refutarían utilizando chimpancés (24) y demostrarían definitivamente su relación con la ECJ, que también pudieron transmitir de la misma forma (25) siguiendo las observaciones previas de Klatzo. Además del Kuru, el *scrapie* y la CJD, poco después se demostró de otras dos enfermedades humanas relacionadas: el insomnio familiar letal (IFF) (26, 27) y el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) (28, 29), que quedaron recogidas bajo el nombre de demencias transmisibles pese a la imposibilidad de aislar el agente infeccioso de las mismas y confirmar así definitivamente la pertenencia de todas ellas al grupo de enfermedades que se denominarían después como EET.

Los primeros estudios de infectividad tratando de entender la naturaleza del agente infeccioso constataron que era un agente transmisible y que se encontraba prácticamente localizado en el sistema nervioso central, que era un agente filtrable (30) y que presentaba largos períodos de incubación (31, 32). Estas características llevaron a los investigadores a pensar que se trataba de un

virus lento, ya que además las EET presentaban diferentes tiempos de incubación, signos clínicos y patrón de lesiones en el encéfalo, en reminiscencia a las diferentes cepas víricas (33). Sin embargo, la teoría del virus lento perdía fuerza con el paso de los años debido a que nadie había conseguido aislarlo. Este hecho junto con la ausencia de la habitual respuesta inmunológica frente a los virus fueron los principales argumentos en contra de la teoría, por lo que surgieron otras posibles explicaciones (viroides, elementos tipo retrovirus o membranas con capacidad autorreplicativa) (15) que tampoco pudieron ser demostradas.

Además de las pruebas antes expuestas que ponían en duda la naturaleza vírica del agente infeccioso de las EET, Tikvah Alper y colaboradores demostraron que el agente infeccioso era resistente a la radiación ultravioleta (utilizada habitualmente para la inactivación de virus) y al tratamiento con nucleasas o cualquier técnica de inactivación de ácidos nucleicos (34). Por lo que todo indicaba que el agente infeccioso carecía de material genético, lo que desafiaba el dogma central de la biología.

No sería hasta 1967 que se propondría un modelo basado en un agente patógeno de naturaleza proteica. El modelo, propuesto por Griffith suponía la existencia de dos estructuras: una estable (A') y una inestable (A). La formación de A sería termodinámicamente desfavorable, por lo que habría pocas unidades de A. Sin embargo, A podría agregar para formar una estructura más estable, A', en un proceso termodinámicamente favorable (35). Aunque teórico, este sería el primer avance significativo hacia la teoría de "solo proteína", ampliamente aceptada hoy en día y que estipula la naturaleza exclusivamente proteica del agente causal de las EET.

2.3 Teoría solo proteína

Dadas las dificultades en demostrar la naturaleza vírica del agente infeccioso de las "demencias transmisibles", era de esperar que se planteasen teorías alternativas al respecto. Tal sería el caso de Stanley Prusiner, que en 1982 (4) presentó la hipótesis de "solo proteína", en la que proponía la existencia de una pequeña partícula infecciosa, sensible a proteasas y agentes alcalinos, pero resistente a los diferentes métodos específicos de inactivación de ácidos nucleicos, por lo que la naturaleza de la misma debía ser exclusivamente proteica. Denominó a esta partícula prion (del inglés *Proteinaceous Infectious Particle*) y fue reconocido por estos estudios con el Premio Nobel de Medicina en 1997. En esta misma década, Patricia Merz y colaboradores presentaron las primeras imágenes de microscopía electrónica del posible agente infeccioso: estructuras fibrilares que solo se encontraban en encéfalos de animales y personas afectadas por una EET, ya fuese *scrapie*, CJD o Kuru. Por la naturaleza fibrilar que se observaba mediante microscopía electrónica con tinción negativa (Figura 2), fueron erróneamente clasificados como virus filamentosos (36), si bien casi de manera simultánea, Prusiner y colaboradores observaron las mismas estructuras, que fueron consideradas como agregados amiloides que denominaron "varillas de prion". A partir de estas varillas consiguieron aislar una proteína de 27-30 kDa (PrP²⁷⁻³⁰) resistente a proteasas y vinculada a la infectividad. Más tarde, la secuenciación de la PrP²⁷⁻³⁰ permitió su identificación como parte de una

INTRODUCCIÓN

proteína mayor, de 33-35 kDa (37), codificada por un gen de copia única llamado *PRNP* que presenta expresión constitutiva en el sistema nervioso central. Estos estudios demostraron que la PrP²⁷⁻³⁰, también conocida como PrP^{Sc} (por su asociación al *scrapie*), y la PrP de 33-35 kDa, conocida como PrP^C (de celular), estaban codificadas en el mismo gen cromosómico (38).

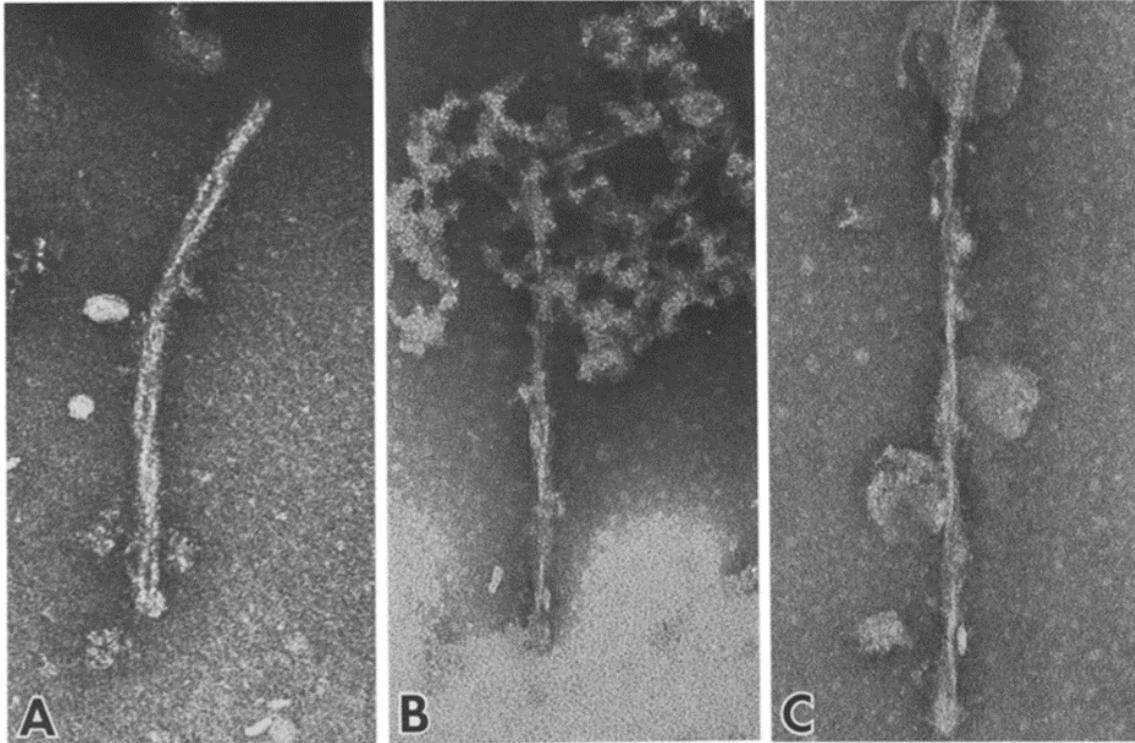


Figura 2. Imágenes de microscopía electrónica de las fibras asociadas a enfermedad priónica obtenidas por Mertz y colaboradores. Fibras SAF (*scrapie associated fibrils*) de tipo 1. A y C) Fibras de ratón inoculado con la cepa 139A. B) Fibras de ratón inoculado con la cepa 87V. Todas las muestras se tiñeron con ácido fosfotúngstico.

Así, la teoría de “solo proteína” propuesta por Prusiner y respaldada por los datos obtenidos en los años siguientes, propone la PrP^{Sc} como el agente etiológico de las EET, siendo esta la variante malplegada de la PrP^C. Los mecanismos moleculares que llevaban al malplegamiento de la PrP^C eran aún desconocidos. Se teorizó que el malplegamiento era fruto de una modificación postraduccional (39, 40), pero no se obtuvieron resultados que confirmaran esta idea (41). No sería hasta después que se propondría a la PrP^{Sc} como causante o inductora del cambio conformacional de la PrP^C, convirtiéndola a una nueva unidad de PrP^{Sc} en un proceso autocatalítico. Este cambio conformacional fue confirmado gracias a resultados de dicroísmo circular donde quedó demostrado que la transformación estaba relacionada con una disminución de la cantidad de hélices α y un aumento de las láminas β en la estructura secundaria de la proteína (42, 43). Este cambio de estructura concordaba con tendencia de la PrP^{Sc} a formar fibras, como las que se observaba en los encéfalos de los individuos afectados (44). A su vez, el cambio conformacional debía también ser el responsable de la resistencia parcial a proteasas que, eliminaban los 90 primeros aminoácidos de la proteína patógena, dando lugar a un núcleo resistente que correspondía con la fracción de 27-30 kDa. La

presencia de estos núcleos resistentes, fácilmente distinguibles de la PrP^C (33-35 kDa), completamente sensible a la digestión por proteasas, mediante electroforesis y su reconocimiento con anticuerpos anti-PrP, es el único marcador patognomónico de las EET. Hecho que solo se ha visto alterado con la descripción de las prionopatías atípicas (6, 45, 46) cuyo núcleo resistente es de menor tamaño.

2.4 Refutación de la teoría de solo proteína: modelos *in vitro* e *in vivo*

La identificación de diferentes mutaciones asociadas a las enfermedades priónicas y la aparición de modelos murinos transgénicos permitieron un gran avance en el estudio de las enfermedades priónicas, así como refutar la hipótesis planteada por Prusiner. Así, la sobreexpresión de PrP en ratones transgénicos con la mutación P102L (asociada a la GSS en humanos) causaba la aparición de una enfermedad neurodegenerativa similar a la humana demostrando la implicación exclusiva de la PrP en la patología (29, 47). Diferentes modelos con mutaciones puntuales han servido para demostrar que un solo cambio aminoacídico puede provocar el malplegamiento espontáneo y que este es transmisible a ratones de genotipo salvaje (wt, del inglés *wild type*). Entre ellos destaca el ratón transgénico con PrP bovina y una mutación asociada al GSS humano (48), los ratones que expresan mutaciones asociadas a CJD y GSS (49) y el modelo de ratón transgénico que expresa la PrP del topillo rojo con el polimorfismo I109I, que resulta en malplegamiento espontáneo (50).

Además de los diferentes modelos *in vivo* que son un claro ejemplo de la relación directa entre la proteína y la enfermedad, existen diferentes sistemas *in vitro* que tratan de emular el malplegamiento de los priones en laboratorio. Gracias a estos sistemas se ha conseguido obtener priones infecciosos *in vitro* a partir de encéfalos de animales sanos (51) que mantienen las propiedades estructurales, biológicas y bioquímicas de la PrP^{Sc} original utilizada como semilla de propagación (52). Sin embargo, los detractores de la hipótesis “solo proteína” (53), no verían evidencias suficientemente sólidas en la propagación de priones *in vitro* dada la necesidad de usar homogenizados de encéfalo como sustrato y una semilla también obtenida de homogenizados de encéfalo de animales infectados, argumentando que componentes no proteicos presentes en los mismos podrían explicar la transmisión o propagación *in vitro* del agente causal. No sería hasta años más tardes, con la incorporación de la PrP recombinante producida en *Escherichia coli* y en ausencia de componentes encefálicos, que se pudieron obtener amiloides de PrP^{Sc} infecciosos en ratones transgénicos (54). No obstante, pese a que esta era una clara evidencia a favor de la teoría, los largos períodos de incubación junto con la necesidad de inocular animales transgénicos que sobreexpresaban la PrP (y que desarrollaban de manera espontánea una prionopatía a edades avanzadas) para observar signos de la enfermedad, podían sugerir que lo que ocurría en realidad era una aceleración de este proceso y no la inducción *de novo* de una enfermedad priónica a causa de las fibras recombinantes inoculadas.

Más tarde, en 2010, se obtendrían priones recombinantes *in vitro* capaces de infectar animales de genotipo silvestre pero que seguían manteniendo períodos de incubación muy largos (55, 56). Por

INTRODUCCIÓN

ello, sería el grupo liderado por el doctor Ma quien ese mismo año obtendría los resultados que supusieron el respaldo definitivo a la teoría formulada por Prusiner. Ya que fueron capaces de generar priones recombinantes murinos *de novo* (sin semilla) utilizando únicamente PrP producida en *E. coli* y ARN y lípidos sintéticos (57) y que mostraban una alta infectividad en ratones de genotipo silvestre con tiempos de incubación similares a priones conocidos, confirmando al fin que el agente infeccioso de las EET tenía una naturaleza exclusivamente proteica y que este era, en sí, la PrP^{Sc}.

En la actualidad, apenas existe controversia respecto a naturaleza del agente etiológico de las EET, dándose por válida la hipótesis de “solo proteína”, a excepción de una pequeña parte de la comunidad científica que aún trata de demostrar la existencia de ácidos nucleicos asociados al patógeno causante de la enfermedad (15). Sin embargo, aún quedan una gran cantidad de aspectos por estudiar dentro del campo de las enfermedades priónicas, como el mecanismo molecular de conversión de la isoforma fisiológica a la patogénica, la posible implicación de otros cofactores, la cascada de eventos que desemboca en procesos neurotóxicos, y fenómenos como la barrera de transmisión y la existencia de cepas priónicas, así como las bases moleculares que subyacen a ellos.

3. Agente etiológico causante de las enfermedades priónicas

Poco después del planteamiento de la hipótesis de solo proteína, el gen codificante de la PrP fue identificado y clonado (37). Pertenece a una familia de genes de tres miembros: el gen *SPRN* que codifica la proteína Shadoo y los genes *PRND* y *PRNP* que codifican la proteína Doppel y la PrP, respectivamente (58). El gen *PRNP* ha sido altamente conservado a lo largo del proceso evolutivo en las diferentes especies de mamíferos, si bien también pueden encontrarse genes parálogos en aves (59), anfibios (60), reptiles (61) y peces (62). La localización de este gen de copia única varía entre las diferentes especies, encontrándose en el brazo corto del cromosoma 20 del ser humano, en la región homóloga del cromosoma 2 murino y en el cromosoma 13 de los rumiantes (63). El gen está formado por dos exones en el caso de los humanos y tres en el caso de los ratones, si bien en cualquiera de los casos contiene un único marco abierto de lectura (*Open Reading Frame*, ORF) que codifica la proteína completa y que se encuentra en un solo exón en todas las especies de mamíferos y de aves en las que se ha estudiado (64).

3.1 PrP^C

3.1.1 SÍNTESIS Y ESTRUCTURA DE LA PRP^C

La PrP comienza a expresarse en etapas tempranas de la embriogénesis y así se mantiene durante el resto de la vida del organismo. Puede encontrarse de manera ubicua, si bien los mayores niveles de expresión en individuos adultos se localizan en el sistema nervioso central, principalmente en las neuronas (65).

La traducción del ARN mensajero para el gen *PRNP* empieza con una secuencia señal N-terminal que lo dirige a la vía secretora. Es por ello que el resto de la traducción se lleva a cabo en la membrana del retículo endoplasmático rugoso, donde se sintetiza una proteína inicial de 235-264 aminoácidos dependiendo de la especie (66). Una vez sintetizada esta proteína inmadura, se suceden una serie de modificaciones postraduccionales en el lumen del retículo endoplasmático. Estas modificaciones incluyen la eliminación del péptido señal de 22 aminoácidos en el extremo N-terminal, la formación de un puente disulfuro entre dos cisteínas internas, la posible N-glicosilación hasta en dos residuos de asparagina y la unión de un anclaje a glucosilfosfatidilinositol (GPI, del inglés *Glycosylphosphatidylinositol*) (67). Dentro del retículo endoplasmático pueden encontrarse hasta tres isoformas de esta proteína: la proteína translocada al lumen tras su síntesis, y dos proteínas transmembrana que presentan bien el extremo N-terminal (^NtmPrP) o el extremo C-terminal (^CtmPrP) hacia el lumen (68, 69). Estas dos variantes transmembrana representan una pequeña proporción de la PrP total, si bien se sabe que un exceso de ^CtmPrP está involucrado en proceso de neurotoxicidad.

Tras las diferentes modificaciones postraduccionales, la proteína final tiene unos 250 aminoácidos y un peso molecular de entre 26 y 37 kDa en función de si presenta ninguna, una o dos glicosilaciones. Continuando la ruta secretora, la PrP pasa por el aparato de Golgi y de ahí es transportada a la superficie de la membrana celular, donde se localiza principalmente en los dominios ricos en colesterol resistentes a la desnaturalización por detergentes (*lipid rafts*) unida a la membrana gracias al anclaje GPI. Pese a que la gran mayoría de la PrP aparece en estas zonas, una parte es transportada a zonas de la membrana cuya cara citoplasmática está recubierta de clatrina; aquí la PrP es reintroducida en la célula mediante un proceso de endocitosis para continuar con su reciclaje constitutivo (70).

Los primeros estudios estructurales de la PrP revelaron una predominancia de α hélice (42), mientras que estudios más detallados por mostraron que el extremo N-terminal presenta un dominio flexible y poco estructurado, tal y como se ha podido confirmar por resonancia magnética nuclear (RMN) (Figura 3) (71, 72). Esta parte de la proteína contiene una secuencia variable, aunque conservada en todos los mamíferos, de ocho aminoácidos que se repite 4 o 5 veces (si bien puede llegar a encontrarse hasta 6 o 7 veces en algunas especies, como es el caso de la vaca), conocida con el nombre de octarrepeticiones (OR, del inglés *octapeptide repeats*) (73). Las OR tienen la capacidad de unir cationes divalentes como el cobre, el zinc o el níquel (74, 75), lo que podrían tener importancia en la actividad fisiológica de la proteína (76, 77). Flanqueando las OR encontramos dos regiones ricas en aminoácidos básicos que se denominan CC1 y CC2 (del inglés, *charged cluster*). Entre el extremo N-terminal desestructurado y el extremo C-terminal globular hay finalmente, una región rica en aminoácidos hidrofóbicos, conocida como HC (del inglés *hydrophobic core*).

El extremo C-terminal presenta una forma globular altamente conservada entre los mamíferos en la que se pueden diferenciar varios dominios. Así podemos diferenciar tres grandes hélices α y dos pequeñas regiones organizadas en hoja plegada β flanqueando la primera de las hélices (78, 79).

INTRODUCCIÓN

Uniendo la primera y la tercera hélice, se encuentra un puente disulfuro, entre las cisteínas 179 y 214 en el caso de la PrP humana. También en este extremo C-terminal se hallan dos residuos de asparagina susceptibles de ser glucosilados, lo que da lugar a tres posibles variaciones de la proteína: no glucosilada, monoglucosilada y diglucosilada. Los oligosacáridos unidos suelen ser ricos en ácidos siálicos y parecen contribuir a la estabilidad de la proteína, ya que generan un campo electrostático negativo que recubre la superficie helicoidal (80). Es por esto por lo que también se les supone un papel en el proceso de propagación priónica, aun sin tener su rol en este proceso completamente definido (81, 82, 83, 84, 85). Es destacable también, que en el extremo C-terminal es donde se localizan la mayoría de las mutaciones puntuales asociadas a los casos genéticos de EET reflejando su relevancia en el proceso patológico (70).

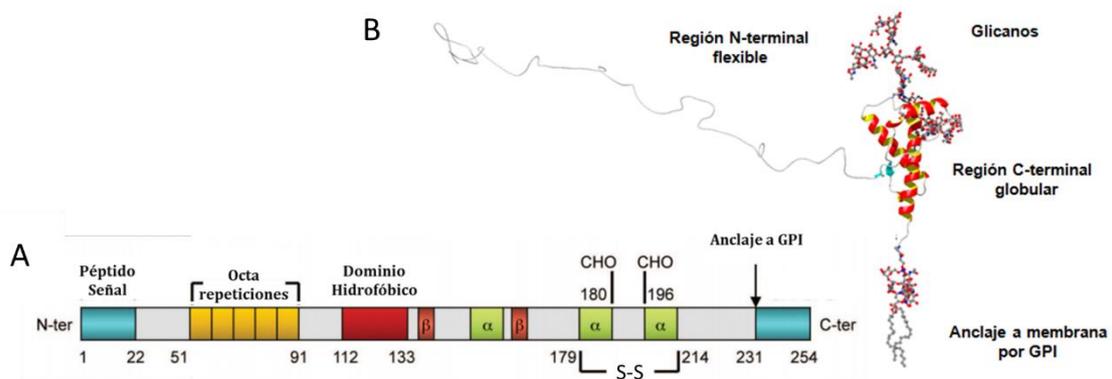


Figura 3. Representación esquemática de la PrP^C y estructura tridimensional resuelta por RMN. A) representación esquemática de los principales elementos de la estructura secundaria de la PrP^C y modificaciones postraduccionales de la PrP^C y modificaciones postraduccionales. Los números hacen referencia a la posición de los aminoácidos. En el extremo N-terminal contiene una señal peptídica de secreción, seguido por la región de octarrepeticiones (indicado en amarillo), tras la cual viene el motivo hidrofóbico que separa el dominio desestructurado y el globular. Ya en el dominio globular se indican las estructuras secundarias que presenta, las 3 hélices- α (en verde) y las 2 hojas- β (en rojo). 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 tridimensional de la PrP^C obtenida mediante RMN. Se puede diferenciar la región N-terminal no estructurada y flexible de la región C-terminal globular y estructurada. Las regiones en lámina- β aparecen de color turquesa y las regiones en α -hélice aparecen de color rojo. (Imagen B modificada de Gill 2017).

Por último, encontramos el anclaje a membrana mediante GPI, añadido en el extremo C-terminal durante su maduración. Este tipo de anclaje está altamente conservado en todos los eucariotas y se puede encontrar en el 10-20% de las proteínas de membrana. La unión de este tipo de anclaje a la proteína es un proceso complejo en el que están implicados más de veinte enzimas en unas diez reacciones que no son completamente conocidas a día de hoy. Sí se conoce, sin embargo, que todas las proteínas con anclaje GPI presentan un péptido señal para su movilización al RE y una secuencia hidrofóbica en el extremo C-terminal que es eliminada por una transaminidasa al añadir el GPI preformado. La estructura del GPI está formada por una etanolamina fosfato que, mediante un enlace amida, se une al extremo carboxilo de la proteína. Presenta un núcleo glucídico altamente conservado, compuesto por tres residuos de manosa, glucosamina, un grupo fosfatidilinositol y colas

fosfolipídicas que se anclan a la membrana celular (86). Las proteínas ancladas a membrana presentan un amplio rango de funciones, por lo que no se le puede conceder una función concreta al GPI unido a la PrP, si bien sí que se le atribuye cierta implicación en el proceso de propagación y en el desarrollo de la patología de las EET: el GPI es responsable de la acumulación de la PrP en las balsas lipídicas, provocando una reducción en la propagación de la versión malplegada causante de la enfermedad, respecto a las proteínas sin GPI y/o deslocalizadas de las balsas lipídicas (87). En investigación, existen ratones transgénicos que expresan una PrP carente del anclaje por GPI a membrana, lo que resulta en grandes placas amiloides cuando son inoculados con priones, si bien la neurotoxicidad es menor (88). Es por ello por lo que, *in vivo*, se asocia al GPI un papel más relacionado con el desarrollo de la patología que con la propagación en sí, dos fenómenos que se han revelado independientes: por un lado está la propagación (malplegamiento de la PrP celular a su versión patogénica y acumulación de agregados amiloides) y por otro lado la neurotoxicidad (principal responsable de la neurodegeneración, mediada por la PrP^{Sc} por mecanismos desconocidos y en la que el anclaje a GPI parece jugar algún papel importante) (88).

3.1.2 FUNCIÓN DE LA PRP^C

Pese al conocimiento acumulado sobre la síntesis y la estructura de la PrP celular (PrP^C), su función fisiológica sigue siendo una de las mayores incógnitas del campo. Como ya se ha mencionado anteriormente, la expresión de la proteína comienza pronto en el desarrollo embrionario (unos días después de la implantación) lo que podría sugerir un papel en este proceso (89, 90). En ratones *knockout* para PrP, se observan alteraciones en la expresión de otros genes durante el desarrollo, lo que podría indicar que otras proteínas tratan de compensar la ausencia de la PrP (91, 92, 93). Según muestran diferentes estudios, parece que la ausencia de PrP durante el desarrollo resulta en una reducción de la proliferación de células madre neurales (94, 95). Sin embargo, se observa una proliferación mayor de células precursoras de oligodendrocitos, acompañada de un retraso en la maduración de los mismos (94, 96). En ratones deficientes para PrP, se ha observado también un desarrollo motor retardado, posiblemente causado por una reducción en el número de conexiones cerebelares, en los que podría estar involucrada la PrP (97). Alejándonos de modelos animales, diferentes estudios *in vitro*, sugieren que la PrP podría estar involucrada en la neuritogénesis (98) y en el crecimiento axonal (99, 100).

En el adulto, la PrP presenta altos niveles de expresión tanto en neuronas como en células de la glía en el sistema nervioso central (101). En el caso de las neuronas, suele localizarse preferentemente en zonas pre y postsinápticas, así como en las terminaciones nerviosas (102, 103, 104). Este patrón de expresión tan concreto sugiere que la PrP podría estar involucrada en preservar las sinapsis regulando la transmisión y la plasticidad de las mismas. Esta teoría se ve, además, apoyada por la pérdida de conexiones sinápticas que ocurre en tantas ocasiones en fases tempranas de las EET (105, 106). En relación a estas, sí queda clara la función conservación de la mielina periférica, tal y como

INTRODUCCIÓN

demuestran varios estudios *in vivo* con ratones deficientes en PrP^C que manifestaban una neuropatía periférica causada por la desmielinización (91, 107, 108).

También se ha relacionado la PrP con la homeostasis y la continuidad del sueño que sería evidenciada en casos clínicos y podría dar explicación a la disrupción del sueño que aparece como signo en algunas enfermedades priónicas, como el FFI (26, 109). Así, en ratones transgénicos con alteraciones en la expresión de PrP, los ritmos circadianos se veían alterados, lo que resultaba en patrones de sueño fragmentado y privación de sueño (110), fenotipos que se corregían si se reestablecía la expresión de PrP (111).

Debido a que no parece haber una función única para la PrP, sino que parece estar involucrada en diversos procesos, se ha planteado la posibilidad de que realmente esté regulando la actividad de otras proteínas mediante distintas formas de interacción, aunque hay que tener una actitud crítica a la hora de analizar el interactoma de la PrP^C. Entre otros, se ha visto que interacciona con la subunidad DPP6 (dipeptidil peptidasa-like 6) del canal de potasio regulado por voltaje Kv4.2, lo que lleva a un incremento en la corriente que pasa a través del canal, causando una reducción en la excitabilidad celular (112). También se ha observado que coprecipita con la subunidad $\alpha 2\delta$ -1 de canales de calcio regulados por voltaje. Aunque la relación entre estos canales y la PrP en condiciones fisiológicas no está clara del todo, sí que se ha detectado una disminución en la posthiperpolarización lenta (sAHP, del inglés, *slow afterhyperpolarization*) en ratones deficientes en PrP, que podría estar causada por descontrol en la homeostasis del calcio (113, 114). La PrP^C también podría actuar como modulador de receptores de glutamato de tipo NMDA (N-metil-D-aspartato), heterotetrámeros formados por dos subunidades GluN1 y dos subunidades GluN2 (115). Se ha observado que la PrP^C previene la excitotoxicidad causada por el influjo de calcio al unirse a los receptores NMDA con la subunidad GluN2 (116).

Estos datos concuerdan con la posible función neuroprotectora que se ha atribuido a la PrP^C en más de una ocasión (117). En casos de isquemia, se puede producir la ruptura del extremo N-terminal y C-terminal de la PrP^C que pueden, a su vez, ser neuroprotectores por separado (118). Así, el extremo N-terminal obtenido después del corte (N1), en casos de apoptosis mediada por Caspasa-3, tiene una función protectora como se ha demostrado tanto *in vivo* (119) como *in vitro* (120, 121). También en otras enfermedades neurodegenerativas parece tener un posible papel protector, ya que el fragmento N1 tiene capacidad de unir oligómeros A β (presentes en amiloidosis y en alzhéimer) (122, 123). Esta unión previene la formación de agregados de A β , lo que reduce la neurotoxicidad causada por los mismos (124). Finalmente, debido a la capacidad para unir cationes divalentes, se ha propuesto un papel protector frente al estrés oxidativo relacionado con especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*), ya sea mediante reacciones de oxidación-reducción mediadas por cobre, como regulando la función de la superóxido dismutasa (125).

Sin embargo, el papel más claro de la PrP^C viene dado en situaciones patológicas, donde sirve de sustrato para la formación de nuevas partículas patogénicas en las EET mediante procesos de

malplegamiento espontáneos e inducidos por la variante conformacional patogénica, la PrP^{Sc}, de la que se hablará más adelante.

3.2 Malplegamiento y formación de agregados proteicos

Las EET o enfermedades priónicas están causadas por una variante conformacional de la PrP^C. El proceso por el cual la configuración tridimensional de la proteína cambia de la variante fisiológica y funcional a la variante patogénica supone un proceso de malplegamiento que sigue siendo desconocido a día de hoy. Si bien, las diferentes aproximaciones que se han llevado a cabo para poner de manifiesto las bases moleculares del proceso nos han permitido entender que este malplegamiento puede resultar en más de una estructura con diferentes propiedades.

3.2.1 PrP^{Sc}

Asociada a los casos de EET aparecen en el encéfalo de los afectados unos depósitos de agregados proteicos de lo que se definió como prion, una partícula infecciosa de naturaleza exclusivamente proteica. Con los diferentes estudios llevados a cabo a lo largo de los años, se identificó que esta proteína patogénica presentaba la misma secuencia de aminoácidos que la PrP^C (126) y debido al extenso estudio de la presencia de esta proteína agregada en la enfermedad del ganado ovino, el *scrapie*, se denominó a esta variante PrP^{Sc}. Las propiedades bioquímicas de ambas isoformas, la fisiológica y la patogénica, permiten discriminarlas con bastante facilidad pese a que comparten la misma estructura primaria. Así, mientras la PrP^C es totalmente digerida por la proteasa K (PK), la PrP^{Sc} presenta una resistencia parcial gracias a la cual la PK solo puede digerir parte del extremo N-terminal además de dar lugar a posibles cortes internos que presumiblemente no desbaratan su arquitectura dada la agregación y el alto grado de empaquetamiento de la estructura (37, 127, 128). La PrP^C es soluble en detergentes, mientras que la PrP^{Sc} es insoluble, por lo que suele encontrarse en forma de agregados de estructuras fibrilares (36, 129, 130, 131). Pese a que la estructura de la PrP^{Sc} es de descubrimiento reciente y aún faltan datos para comprender en su totalidad las variaciones posibles en su estructura, sí se sabe que, mientras que la PrP^C presenta un predominio de α -hélice, la PrP^{Sc} carece de esta estructura secundaria y está compuesta casi al completo de lámina β . Debido a esto y a que se sabe que ambas conformaciones comparten estructura primaria, incluyendo las modificaciones postraduccionales, se acepta que ambas isoformas difieren en la conformación tridimensional, en el estado de agregación y/o en la posible unión con un ligando que, a día de hoy, permanece desconocido (132).

Descifrar la estructura de la PrP^{Sc} es un hecho clave para la comprensión de las bases moleculares que subyacen en la propagación y formación de priones. Pero precisamente por las características bioquímicas de la PrP^{Sc} (insoluble y formando agregados) y la variedad estructural (debida a la presencia de oligómeros de diferentes tamaños y a la presencia de variantes no glucosiladas, monoglucosiladas y diglucosiladas), la utilidad de técnicas como la resonancia magnética nuclear

INTRODUCCIÓN

(RMN) o la cristalografía de rayos X es limitada (133). Es por ello por lo que durante muchos años solo se ha obtenido una información fraccionada y a baja resolución de la estructura de la PrP^{Sc}. Mediante técnicas de espectroscopía, como el uso de espectroscopía de infrarrojos (FTIR, del inglés, *Fourier transform infrared*) o el dicroísmo circular (CD, del inglés, *circular dichroism*) se ha comprobado que la PrP^{Sc} presenta un contenido rico en láminas β (42, 134, 135). Aunque en un principio se creyó que presentaba un pequeño porcentaje de hélice- α , que resultó ser artefactual, a día de hoy se sabe que la PrP^{Sc} está exclusivamente formada por estructura en lámina- β y partes sin estructura secundaria determinada (136, 137, 138, 139). Entre otras técnicas, la proteólisis limitada ha servido de referencia para conocer qué partes de la fibra están más expuestas (140). Mediante el mapeo por epítomos usando diferentes anticuerpos, se ha conseguido conocer la existencia de un núcleo altamente resistente (que engloba desde la posición 90 hasta la 120, aproximadamente) y zonas de fácil accesibilidad en el extremo C-terminal (141). Quizá una de las técnicas que más información ha aportado sobre la estructura de la PrP^{Sc} es la difracción de rayos X (142). El análisis de fibras purificadas a partir de encéfalo confirmó la existencia de amiloides de lámina β y que, junto con otros datos obtenidos, suponía una estructura en β hélice o en β solenoide (142). La resonancia magnética nuclear (RMN), especialmente la de estado sólido, también ha sido de utilidad para estudiar la estructura de la PrP^{Sc}, utilizando amiloides de PrP recombinantes marcadas con ¹³C y ¹⁵N (143), dando como resultado la caracterización de un núcleo C-terminal rico en lámina β , siendo el extremo N-terminal flexible.

También se han obtenido imágenes directas de las fibras. Para ello se han utilizado diferentes técnicas de microscopía, como la microscopía electrónica de transmisión (MET) (144), microscopía de fuerza atómica (145) y criomicroscopía electrónica (cryo-EM, del inglés *cryogenic electron microscopy*) (146), que han permitido conocer ciertas características estructurales. La MET combinada con la tinción negativa de la muestra se ha empleado para medir el diámetro de las fibras de PrP^{Sc} (142, 145) y para la detección de cepas priónicas que no forman fibras detectables (147, 148). Por su lado, la cryo-EM ha permitido generar reconstrucciones tridimensionales de las fibras (146) y desentrañar por primera vez la estructura de prion mamífero (149).

La recopilación de los datos obtenidos mediante esta variedad de técnicas ha dado lugar al planteamiento de diferentes modelos estructurales que han ido cambiando y actualizándose con el paso de los años y a la luz de nuevas evidencias experimentales.

❖ MODELO DE HÉLICE-B

Este modelo propone una estructura en hélice- β para la forma malplegada de la PrP (Figura 4A), es decir, una estructura formada de la asociación de láminas β antiparalelas en un patrón helicoidal con tres caras con una altura de 38.4 Ångstroms (Å), lo que equivale a ocho láminas- β (150). Se considera un modelo muy poco probable debido a que no existe ninguna proteína de estructura conocida que se asemeje a este modelo (151) y a que los datos de difracción de rayos X descartan que los monómeros de PrP^{Sc} puedan presentar esta altura (142).

❖ MODELO DE LÁMINA-B EN SOLENOIDE DE CUATRO PISOS

Este modelo propone una estructura de láminas- β enrolladas sobre sí mismas formando un solenoide. Cada molécula de PrP^{Sc} formaría cuatro pisos de este solenoide y se colocarían unas sobre otras formando la fibra. Este modelo explicaría la aparición de señales observadas en experimentos de difracción de rayos X a 4.8 Å y a 19.2 Å, que corresponderían a cada piso del solenoide y a una molécula de PrP^{Sc} respectivamente (Figura 4B) (142, 152). Este modelo también ha sido refutado por reconstrucciones tridimensionales de muestras visualizadas mediante cryo-EM (146, 153), donde se propone una fibra formada por dos protofilamentos de PrP^{Sc}, donde las láminas- β se localizarían de manera perpendicular al eje de la fibra.

Este modelo presenta dos posibles variantes en función de cómo se organizan los monómeros de PrP^{Sc} dentro del protofilamento. Teniendo en cuenta que cada molécula se enrolla sobre sí misma en un solenoide de láminas β , la parte inferior de este solenoide correspondiente al extremo N-terminal se conocería como cola y la parte superior correspondiente con el extremo C-terminal sería la cabeza. Así, las diferentes moléculas podrían unirse unas a otras siguiendo un esquema de cabeza a cola (todas las moléculas tienen la misma orientación dentro de la protofibra) o de cabeza a cabeza y de cola a cola (por lo que estarían con orientaciones alternas dentro de la protofibra). Este segundo modelo podría explicar la aparición de señales en torno a los 40 Å en difracción de rayos X (146), que supondrían un dímero de PrP^{Sc} unidos cabeza-cabeza o cola-cola.

Igualmente, datos de proteólisis límite con PrP^{Sc} purificada de encéfalo y priones recombinantes que han mostrado capacidad infectiva *in vivo* respaldan también este modelo (140, 154).

❖ MODELO DE LÁMINA-B PARALELA EN REGISTRO

Este modelo propone una estructura plana para la proteína que se uniría a otras formando hojas plegadas β en registro, permitiendo un crecimiento infinito de las fibras. De esta manera, cada PrP^{Sc} unida a la fibra aportaría una altura de 4.9 Å (Figura 4C) (137). Este modelo se basó originalmente en estudios *in silico* de dinámica molecular (MD, del inglés *Molecular Dynamics*) y en los datos obtenidos por intercambio de hidrógeno-deuterio con PrP recombinante, si bien las fibras analizadas en este estudio no eran infectivas *in vivo* (155). No obstante, este modelo ha sido refutado con los datos obtenidos en RMN de estado sólido describiendo la cepa Y145Stop (156) y los estudios realizados en ratones transgénicos con PrP sin GPI, que podría ser el modelo con más similitud a los priones de encéfalo estudiados hasta la fecha (136). Recientemente, un estudio realizado por cryo-EM con fibras de PrP humana recombinante ha proporcionado una imagen de alta resolución que correspondería con este modelo propuesto (157) y que mostraría dos protofibras entrelazadas en una hélice levógira.

Finalmente, el análisis mediante cryo-EM de fibras amiloides de priones de mamífero han conseguido respaldar ese modelo, resultando en la definición de una estructura fibrilar formada por capas

INTRODUCCIÓN

constituidas por una única molécula de PrP que establecería puentes de hidrógeno intermoleculares para formar lámina β en registro (149).

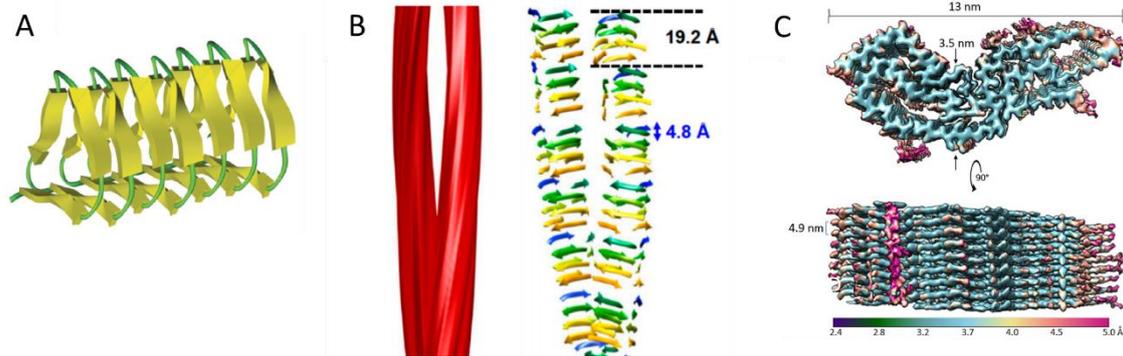


Figura 4. Representación de los diferentes modelos estructurales de las fibras de PrP^{Sc}. A) Modelo β -hélice (modificado de Choi 2008). B) Modelo de lámina- β en solenoide de cuatro niveles (Modificado de Wille 2018). C) Estructura de un prion mamífero resuelta mediante cryo-EM, correspondiente al modelo lámina- β paralela en registro (Kraus 2021).

3.2.2 MODELOS DE CONVERSIÓN

Tal y como establece la teoría de “solo proteína” propuesta por Prusiner, el prion es un agente infeccioso autocatalítico, es decir, que tiene la capacidad de generar nuevas partículas infectivas por sí solo. Una vez conocida la naturaleza del agente infeccioso y su relación con la proteína nativa, es lógico establecer la relación entre ambos: la PrP patogénica (PrP^{Sc}) debe ser el agente causante del cambio conformacional en proteínas de PrP celulares (PrP^C) induciendo el malplegamiento de la misma hasta generar nuevas PrP^{Sc}. Sin embargo, al igual que otros aspectos en el campo de los priones, los mecanismos moleculares por los que este proceso ocurre siguen siendo desconocidos en la actualidad. Pese a ello, sí que existen diferentes experimentos que han demostrado la interacción directa entre la PrP^C y la PrP^{Sc} (158, 159), si bien el complejo PrP^C/PrP^{Sc} no ha sido aislado aún, por lo que su existencia se mantiene en entredicho (64).

Igualmente, el lugar en el que ocurre esta interacción sigue sin quedar claro. Aunque se ha analizado la distribución de PrP^C y PrP^{Sc} en cultivos celulares, la poca inmunorreactividad de los agregados de PrP^{Sc} y las limitaciones para distinguir mediante el uso de anticuerpos la PrP^C de la PrP^{Sc} han dificultado esta tarea. La mayoría de los datos recabados indican que la interacción con PrP^{Sc} exógena debe ocurrir en las balsas lipídicas donde la PrP^C suele estar concentrada y unida a la membrana por el anclaje a GPI (40) y/o en endosomas (160, 161, (162)). En estos ambientes, la PrP^{Sc} sería capaz de resistir incluso la digestión lisosomal. Como ya se ha mencionado, una de las características que diferencian la PrP^C de la PrP^{Sc} es la resistencia parcial al tratamiento con PK, que deja un núcleo intacto de 27-30 kDa (a diferencia de la proteína completa, que pesaría unos 33-35 kDa) que mantiene la infectividad.

Sí se sabe, sin embargo, que la forma más infecciosa en la que se puede encontrar la PrP^{Sc} es en forma de oligómeros, que se ensamblan de manera espontánea y que suponen un centro de nucleación para

la propagación del prion (163). En concreto, los oligómeros que presentan entre 14 y 28 moléculas de PrP^{Sc} suponen la partícula más infectiva (164).

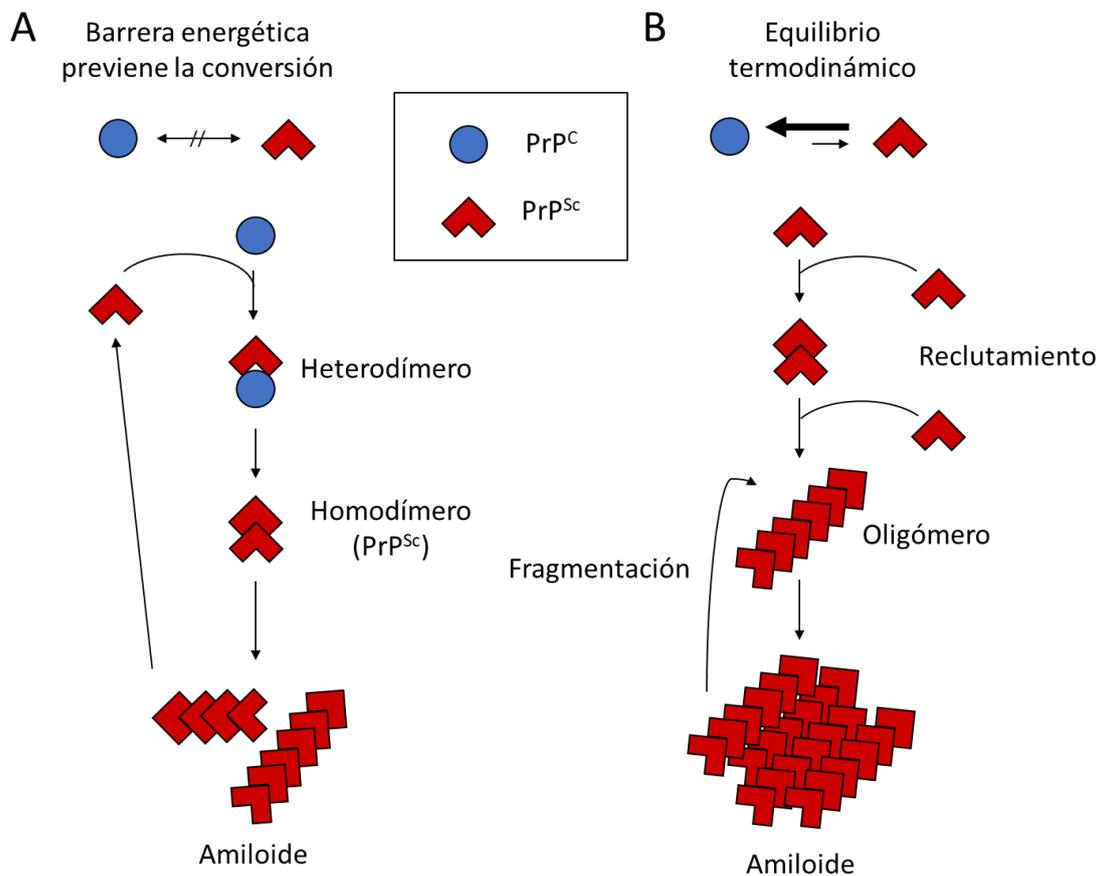


Figura 5. Representación esquemática de los modelos de conversión de priones. A) Modelo de conversión inducida por molde. B) Modelo de nucleación-polimerización.

Para explicar el cambio de configuración causado por la interacción entre la PrP^{Sc} y la PrP^C y la subsiguiente formación de fibras priónicas, existen dos modelos (Figura 5):

A) Modelo de conversión inducida por molde: este modelo propone que la PrP^{Sc} monomérica actúa como un molde conformacional que promueve la conversión de la PrP^C monomérica al unirse a ella, formando un intermediario conformacional (heterodímero) que se transformará posteriormente a un dímero de PrP^{Sc}. Este dímero se uniría a su vez con otros dímeros para formar agregados o fibras de mayor tamaño. De manera natural, existe una gran barrera energética que previene la conversión espontánea de PrP^C a PrP^{Sc}, por eso este modelo propone a la PrP^{Sc} como agente catalítico que, al unirse a la PrP^C, reduciría la energía necesaria para el cambio conformacional. Con este modelo propuesto siempre sería necesaria la aportación de PrP^{Sc} externa (165), por lo que quedarían sin explicación las EET esporádicas y genéticas. Sin embargo, se postula que la existencia de mutaciones en el gen *PRNP* podrían aumentar la inestabilidad de la PrP^C, reduciendo a su vez esa barrera energética y favoreciendo la aparición

INTRODUCCIÓN

de un estado alterado conocido como PrP*. Esta PrP* sería un estado intermedio entre la PrP^C y la PrP^{Sc} y su aparición podría estar mediada por la unión con una molécula X. Posteriormente, la interacción entre la PrP^{Sc} y la PrP* o de dos unidades de PrP* catalizaría el final de la conversión, obteniendo un homodímero de PrP^{Sc} (166, 167).

B) Modelo de nucleación-polimerización: este modelo propone que la PrP^C y la PrP^{Sc} coexisten en un equilibrio termodinámico reversible que, en un estado fisiológico sano, está desplazado hacia la formación de PrP^C. De esta manera, los monómeros de PrP^{Sc} representarían un porcentaje menor. Este equilibrio solo se rompería cuando varias unidades de PrP^{Sc} se unieran formando núcleos de propagación (fase de latencia). Estos núcleos o semillas infectivas acumularían PrP^{Sc} formando amiloides (fase de crecimiento exponencial). Posteriormente la fragmentación de estos agregados amiloides daría lugar a la liberación de nuevas semillas infectivas que repetirían el ciclo (168). Las mutaciones en el gen *PRNP* generarían un desequilibrio termodinámico que favorecería la aparición de más PrP^{Sc}, siendo las mutaciones asociadas a enfermedades priónicas las que aumentan la tendencia al malplegamiento (169, 170, 171). El factor limitante de todo el proceso sería la fase de latencia (172), que se vería favorecida al añadir semilla de manera exógena, tal y como ocurriría en las EET adquiridas (173).

En la actualidad, ninguno de los dos modelos ha sido confirmado, existiendo pruebas a favor y en contra de ambos. Este es el caso, por ejemplo, de la molécula X, parte fundamental del modelo de conversión inducida por molde, que nunca ha sido identificada o aislada. Al principio se pensó que debía ser de naturaleza proteica, pero la obtención de priones recombinantes *in vitro*, con componentes sintéticos y definidos (57), demostró que este componente X podría tener otro tipo de composición. Sí cuenta con soporte experimental la existencia de un estado intermedio entre la PrP^C y la PrP^{Sc} que correspondería con la PrP* (83, 174). Por otro lado, existen evidencias que respaldan el modelo de nucleación-polimerización, como los modelos matemáticos (175) y los modelos cuantitativos obtenidos en diferentes ensayos de conversión *in vitro* (164), aunque siguen siendo insuficientes para inclinar definitivamente la balanza a favor de alguno de los dos modelos.

3.2.3 OTROS AMILOIDES DE PRP

Una de las evidencias más sólidas a favor del modelo de propagación inducida por molde proviene de experimentos realizados con fibras o amiloides no priónicos de PrP. Estas fibras amiloides de naturaleza recombinante se han obtenido *in vitro* mediante procesos que favorecen la desnaturalización parcial de la PrP recombinante (rPrP), en presencia de agentes caotrópicos. Más allá del aspecto amiloide y sus características generales, estas fibras carecen de las características definitorias de la PrP^{Sc}. Por ejemplo, carecen de la resistencia característica a proteasas y son fácilmente digeridas al tratarlas con PK (176). Además, cuando estas fibras son inoculadas, los animales carecen de signos clínicos de enfermedad y el análisis de sus cerebros no revela presencia alguna de PrP^{Sc}. Si bien, en un segundo pase en animales (utilizando los homogeneizados de los

cerebros de los animales inoculados con estas fibras como semilla para el segundo pase), sí que da lugar a signos propios de una prionopatía y el análisis histoquímico y bioquímico de los cerebros revela la existencia de placas y PrP^{Sc}, típicas en las EET (176). Este hecho podría explicarse si, en el primer pase *in vivo*, lo que ocurre es una deformación inducida por molde (amiloide no priónico) que, a su vez, favorecería el malplegamiento a PrP^{Sc} en un segundo pase. Además, es un claro ejemplo de la plasticidad estructural de la PrP, que puede presentar varias configuraciones espaciales diferentes a la PrP^C y a la PrP^{Sc}. Es pues importante diferenciar los diferentes tipos de agregados que se pueden obtener así como sus características.

Las proteínas amiloidogénicas con una misma secuencia polipeptídica pueden agregarse adoptando diferentes estructuras amiloides, lo que se conoce como polimorfos. Cada polimorfo puede propagarse mediante un proceso dependiente de nucleación o siembra, transmitiendo su conformación a otras proteínas. Y muchas de estas variantes amiloides pueden no estar relacionadas con ninguna patología e incluso constituir lo que se denominan amiloides funcionales (177). Se distinguen pues priones *bona fide* con características amiloidegénicas, autopropagativos, resistentes a proteasas y capaces de generar una prionopatía *in vivo*, de otros agregados amiloides de PrP (PrP^{res}, ya que presenta resistencia a proteasas) que no presentan todas las características de los priones *bona fide*.

Esta plasticidad estructural, el hecho de que con una sola secuencia pueda presentar varias conformaciones tridimensionales, es la que más tarde nos permitirá explicar el fenómeno de cepa priónica, siendo estas variantes con una misma estructura primaria pero que dan lugar a diferentes manifestaciones sistémicas en cuanto a signos y síntomas de la enfermedad.

3.3 Efectos sistémicos del cambio conformacional: neurotoxicidad

El cambio conformacional de PrP^C a PrP^{Sc} desencadena no solo la formación de fibras y el crecimiento exponencial de los agregados de PrP^{Sc}, sino que también trae consigo una serie de procesos fisiológicos que son los que, en definitiva, causan la sintomatología característica de las EET. Sin embargo, los mecanismos neurotóxicos de los priones no están del todo claros.

Los depósitos de PrP^{Sc} son los primeros en aparecer en la cascada de eventos de las enfermedades priónicas, seguidos de una activación de la microglía y la aparición de vacuolas, que otorgan el aspecto esponjiforme al encéfalo que da nombre a este tipo de enfermedades. Este daño tisular parece estar relacionado con diferentes procesos, como el procesamiento proteico, el estrés oxidativo y la activación de vías de autofagia y apoptosis (178). Pese a la clara relación que hay entre la PrP^{Sc} y las enfermedades priónicas (a día de hoy se acepta de manera generalizada como la unidad portadora de la infectividad) y a que hay ciertos indicios de que las formas oligoméricas de PrP^{Sc} son las principales causantes de los procesos neurotóxicos (179), no queda tan claro que esta sea la

INTRODUCCIÓN

responsable última de la neurotoxicidad (180), sino que parece que es la interacción de esta con la PrP^C lo que media este proceso (180, 181, 182).

Los modelos murinos *knockout* para la PrP demostraron que la neurodegeneración característica de este tipo de enfermedades no venía causada por la ausencia de PrP^C o por la pérdida de su función al transformarse en PrP^{Sc} (181). De hecho, la presencia de PrP^C es necesaria para el desarrollo de los procesos neurotóxicos, tal y como demuestran los experimentos realizados en animales con una infección priónica preestablecida a los que se les eliminó posteriormente la PrP^C, provocando una desaparición de los efectos neurotóxicos y evitando la pérdida neuronal y la progresión de la enfermedad. Los datos experimentales indican que es necesaria la presencia de PrP^C en la membrana para transducir la señal tóxica al interior de la célula (114, 180). Este es pues un caso de subversión de la función de la proteína (183), en el cual la interacción entre la PrP^C y la PrP^{Sc} modifica la función normal de la PrP^C y desencadena la respuesta neurotóxica. Esta respuesta puede llevarse a cabo por diversas vías:

- A) Autofagia: se ha identificado en diversas ocasiones la presencia de vesículas autofágicas en EET (184, 185, 186). Según ha sido comprobado experimentalmente, la PrP^C parece tener un papel en la regulación de la autofagia en las neuronas puesto que su ausencia provoca un incremento de la vía autofágica (187), por lo que la subversión o pérdida de función por parte de la PrP^C podría activar esta vía. Sin embargo, el uso de fármacos para inhibir o inducir la autofagia no parece tener efecto en el desarrollo de la enfermedad por lo que debe actuar como un mecanismo secundario en la neurodegeneración (188, 189).
- B) Apoptosis: tanto en modelos experimentales como en pacientes con EET se ha comprobado la activación de rutas de muerte celular programada, como la fragmentación de ADN o la activación de caspasas, lo que podría justificar la muerte neuronal por esta vía (190, 191, 192).
- C) Vía mitocondrial: la activación de esta vía de neurotoxicidad fue identificada en modelos celulares (193, 194, 195). La presencia de agregados de PrP genera alteraciones en la membrana de la mitocondria, lo que provoca la liberación del citocromo C, la activación de caspasas y, en última instancia, la muerte neuronal.
- D) Vía del retículo endoplasmático (RE): esta vía, importante en la regulación de la apoptosis, está relacionada con la homeostasis de los iones de calcio (Ca²⁺), que en situaciones de estrés sería liberado del lumen y activaría la caspasa-12 presente en la membrana del RE desencadenando la respuesta apoptótica. Además, el Ca²⁺ está involucrado en los procesos de sinapsis, memoria y muerte celular (196) mediados por calcineurina. La desregulación del Ca²⁺ intracelular se ha descrito en diferentes EET (197) y, de hecho, se ha demostrado que la acumulación de PrP^{Sc} provoca la desregulación de la actividad de la calcineurina, lo que podría llevar a la muerte celular (198).
- E) Respuesta a proteínas malplegadas (UPR, del inglés *unfolded protein response*): esta es una respuesta que busca reestablecer la homeostasis, afectando a la expresión de chaperonas,

que degradan las proteínas malplegadas o desplegadas, e inhibiendo la síntesis de otras proteínas (199). La UPR se activa cuando se detecta un incremento de proteínas malplegadas o desplegadas, por lo que es esperable encontrarla activada en enfermedades priónicas y, de hecho, como se ha comprobado experimentalmente, la activación persistente de esta vía provoca un fallo sináptico, la pérdida neuronal y la aparición de espongiosis en casos de EET (200).

- F) Activación de la microglía: la microglía es la responsable de la respuesta inmunológica en el SNC y, si bien es importante para el mantenimiento de un estado normal, su activación puede causar o contribuir al daño neurológico (201, 202). En el caso de las EET, la activación de la microglía ocurre antes de la pérdida neuronal y del cambio esponjiforme del cerebro (203). Aunque la activación inflamatoria asociada a las enfermedades priónicas (así como el daño resultante de un proceso inflamatorio prolongado) se atribuye principalmente a la microglía (204), la eliminación de la misma en modelos de ratón inoculados con priones conlleva una aceleración de la aparición de los signos (205), por lo que su papel parece ser más beneficioso que dañino durante el curso de la enfermedad.

Si bien estos parecen ser los mecanismos generales activados en las enfermedades priónicas en general, estas presentan una variedad fenotípica ya no solo en los signos que manifiestan los afectados, sino también en los tiempos de incubación y en el período que abarca desde la aparición de los primeros signos hasta la muerte. Esta variabilidad no siempre viene dada por cambios en la secuencia aminoacídica, sino que es intrínseca del prion en sí y es lo que subyace detrás del fenómeno de cepa priónica.

4. Fenómeno de cepas priónicas

En animales afectados por priones, se ha observado la aparición de diferentes patologías, así como de diferentes características tanto a nivel clínico como bioquímico, que podían ser mantenidas a través de diferentes pases sucesivos en modelos animales (173, 206). Por analogía con otros agentes infecciosos, a esta variedad de priones procedentes de diferentes aislados biológicos con características definidas se les llamó cepas. El fenómeno de cepas priónicas y descifrar los mecanismos moleculares que la rigen son de los aspectos más interesantes dentro del campo y que dentro del marco de la teoría de “solo proteína”, permite explicar la variabilidad de las prionopatías (207, 208). Al principio se asumió que las diferencias en los fenotipos de los animales se debían al *background* genético de cada individuo o a mutaciones en el gen que codificaba para el agente causal de las EET. Sin embargo, en la actualidad la gran mayoría de investigadores del área acepta que, pese a que se mantenga la misma estructura primaria, pueden surgir distintas cepas priónicas y que estas se deben a diferencias en la conformación de la PrP^{Sc} que son estables y se transmiten inalteradas durante el proceso de propagación (209, 210). Dependiendo de la bibliografía consultada, la definición de cepa varía ligeramente ya que, a diferencia de otros agentes infecciosos, en los priones

INTRODUCCIÓN

no pueden clasificarse por mutaciones en una secuencia nucleotídica. A efectos prácticos, se han definido las cepas priónicas en base a un fenotipo de enfermedad concreto que surge cuando los parámetros de agente infeccioso y hospedador son fijos, lo que incluiría el título del inóculo o el genotipo de la PrP, entre otros (211). Sin embargo, dada la amplia aceptación de que los cambios en las propiedades biológicas vienen codificados por diferencias en la estructura terciaria y/o cuaternaria del prion, también se suele definir una cepa priónica como un confórmero autorreplicativo de la PrP que produce un fenotipo concreto de enfermedad priónica. Y, de hecho, existen evidencias sólidas que respaldan que las diferencias entre las cepas priónicas residen en alteraciones en la estructura de la PrP^{Sc} (212), por lo que utilizaremos principalmente esta segunda definición que relaciona directamente distintos confórmeros con potenciales cepas.

4.1 Caracterización de las cepas priónicas

Debido a los avances en biología molecular y a la incorporación de los datos bioquímicos, histológicos y a la posibilidad de estudiar en profundidad las características de la PrP^{Sc}, la caracterización de las cepas priónicas a día de hoy puede realizarse por métodos más allá de la descripción de los signos clínicos. Así, hoy en día se utilizan una serie de características bioquímicas y biológicas que permiten la distinción e identificación de cepas.

CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA

- A) Signos clínicos: las enfermedades priónicas pueden manifestarse con diferentes signos clínicos que permiten la diferenciación de cepas y, de hecho, fue gracias a la aparición de diferentes signos que empezó a surgir la idea de la existencia de cepas en este campo. Esta propiedad ha sido muy útil en el estudio de las enfermedades priónicas en algunas especies (como el ganado ovino) (213) pero insuficiente en otros (como los ratones) (214).
- B) Periodo de incubación: uno de los criterios observables más utilizados para determinar la identidad de un prion es el período de incubación. Este parámetro solo puede ser medido en condiciones controladas de laboratorio en la que se puede medir correctamente el lapso de tiempo entre la infección y la manifestación de los primeros signos. La alta reproducibilidad de este método (215) suele asegurar que la inoculación de diferentes cepas priónicas dé como resultado tiempos de incubación estables y reproducibles característicos de la cepa y modelo animal usados (215, 216).
- C) Patrón de lesiones: los estudios histológicos también han revelado la presencia de diferencias significativas dependientes de la cepa priónica. Estas diferencias se basan principalmente en la distribución y el tipo de depósitos de PrP^{Sc}, y en el grado de vacuolización observados (217, 218, 219, 220). Para el estudio del daño histopatológico se diferencian habitualmente nueve regiones cerebrales, descritas en

1968 como método sistemático para describir el daño tisular observado en ratones inoculados con *scrapie* (221). Es el conocido como patrón de lesiones que engloba seis regiones de materia gris y tres regiones de materia blanca (220). El daño presente en diferentes áreas del cerebro también explica la aparición de signos clínicos distintos dependientes de cepa (55, 222). Pese a que este fenómeno de tropismo celular, de preferencia por ciertas áreas, se ha estudiado extensamente, se desconoce el mecanismo molecular que subyace (223).

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

- A) Movilidad electroforética: a nivel bioquímico, la movilidad electroforética observada tras la digestión con PK es el método más utilizado para diferenciar cepas. La resistencia parcial de la PrP^{Sc} a la digestión con proteasas genera un núcleo PK-resistente dependiente de la cepa que puede ser fácilmente distinguible mediante *Western blot* (WB) (212, 224, 225, 226). Si bien es posible encontrar cepas con fenotipos diferentes que son electroforéticamente indistinguibles (214).
- B) Patrón de glucosilación: relacionado con el apartado anterior puesto que también se analiza tras la digestión con PK. La PrP presenta dos residuos de asparagina que son susceptibles de ser glucosilados. De esta manera encontraríamos PrP no glucosilada, monoglucosilada o diglucosilada. La proporción relativa de estas tres formas en las que puede encontrarse la PrP en encéfalo es característica de cada cepa priónica (212, 225, 227).
- C) Resistencia a proteólisis y a procesos desnaturalizantes: el decaimiento de la señal de PrP^{Sc} en WB con el incremento paulatino de la concentración de proteasas es comúnmente utilizado en investigación para la identificación de posibles cepas priónicas diferentes, al igual que la resistencia a agentes caotrópicos que presenta cada conformero, que también se evalúa mediante digestión proteolítica (224, 228).

La caracterización biológica y bioquímica de las cepas priónicas comienza a ser apoyada por nuevas técnicas que ofrecen información directa acerca de la estructura tridimensional de la PrP^{Sc}. Estudios realizados con inmunoensayos dependientes de la conformación espacial (228, 229) y el análisis por espectroscopia de infrarrojos, dicroísmo circular y microscopía de fuerza atómica (228, 230, 231, 232), además de ayudar a distinguir potenciales cepas, aportan evidencias cada vez más robustas que confirman que las diferencias entre cepas priónicas se deben a variaciones en la estructura de la PrP^{Sc}.

INTRODUCCIÓN

4.2 Propiedades de las cepas priónicas *in vivo*

COEXISTENCIA

Las primeras evidencias de la existencia de cepas priónicas se remontan a 1961 cuando Pattison y Millson describieron diferentes signos en cabras afectadas por *scrapie*. A partir de un mismo aislado, las cabras inoculadas desarrollaban dos fenotipos clínicos diferentes que se denominaron *scratching* y *drowsy*. Y, si bien en un principio las diferencias se atribuyeron al diferente *background* genético de cada animal, hoy día se aceptan como dos cepas priónicas diferentes que pueden ser propagadas de manera independiente (44). El hecho de que ambos fenotipos surgieran de un único aislado es una de las primeras evidencias que se tiene de una de las propiedades que presentan las cepas priónicas *in vivo*, y es que dentro de un mismo hospedador pueden coexistir varias cepas.

Se han reportado casos de CJD esporádico en los que el análisis de diferentes áreas del cerebro revelaba la presencia de diferentes cepas priónicas (233, 234). Si bien la tendencia a la coexistencia de cepas en humanos parece también estar condicionada por la genética del individuo (233).

ADAPTACIÓN Y/O SELECCIÓN

La transmisión de priones de unas especies a otras es una de las principales fuentes conocidas de material infeccioso con características de nuevas cepas. Uno de los casos más claros de obtención de nuevas cepas mediante transmisión a otras especies es el caso de las cepas *Hyper* (HY) y *Drowsy* (DY) (209, 222). En el proceso de transmisión interespecies son necesarios varios pases en el hospedador final en la gran mayoría de casos para estabilizar las características del nuevo material infeccioso. En el caso de HY y DY, se originaron en hámster inoculados con cerebros de visones afectados por una prionopatía propia de dicha especie (encefalopatía transmisible del visón, TME del inglés *transmissible mink encephalopathy*) (209). Se cree que ambas cepas coexistían en el inóculo original y que se pudieron separar gracias a la metodología empleada: experimentos donde se diluía el inóculo lo máximo posible (dilución límite) que permitieron separar ambas cepas (209). Una de ellas quedaría encubierta al estar en menor proporción y, de hecho, hay evidencias que demuestran que ambas presentan cinéticas diferentes, siendo DY más lenta que HY (235), pese a ser DY más abundante en el cerebro. Tras sucesivos pases para la estabilización de las cepas, estas eran claramente distinguibles: presentaban diferentes períodos de incubación (150 días en el caso de DY y 60 en el caso de HY), signos (letargo e hiperactividad, respectivamente) (222) y el análisis bioquímico e histológico revelaba diferentes movilidades electroforéticas, estabilidad en presencia de agentes desnaturizantes y patrón de lesiones (224, 230, 236).

El análisis de estos hechos puede realizarse desde dos puntos de vista: en la primera, el inóculo consiste en una sola cepa original y la aparición de una segunda tras el cambio de especie se debería a modificaciones promovidas por el cambio de entorno que ocurre durante el proceso de

propagación (principalmente en el sustrato de conversión, que es la PrP^C) que terminarían por establecerse (adaptación) (Figura 6A); en la segunda, podríamos entender el inóculo original como un conjunto de diferentes conformeros en proporción variable, donde uno de ellos, con una estructura de PrP^{Sc} concreta, sería el mayoritario y el que domina la propagación en el hospedador original, mientras que el paso a una nueva especie provocaría un cambio en las proporciones revelando otros subtipos antes minoritarios, pero con mayor capacidad de inducir su malplegamiento en la nueva PrP^C (selección) (Figura 6B) (237). E incluso sería probable que ambos fenómenos no sean excluyentes mutuamente y pueda producirse una combinación de ambos.

Aunque las bases moleculares estos fenómenos son completamente desconocidos en la actualidad, la aparición de nuevas cepas priónicas a partir de un mismo inóculo o aislado es un claro indicio de la capacidad que tienen los priones para adquirir nuevas propiedades que permiten su propagación en nuevos entornos (en el caso de DY y HY estos entornos serían el encéfalo del visón y el encéfalo del hámster).

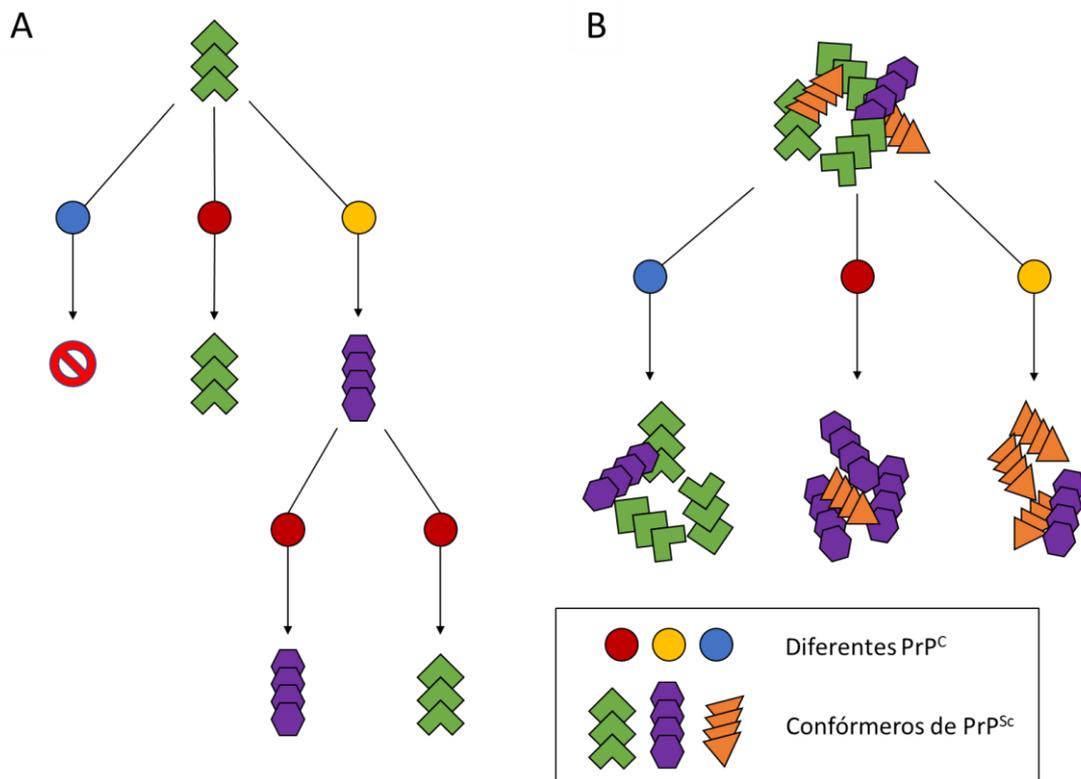


Figura 6. Modelos de emergencia de nuevas cepas priónicas debido a la barrera de transmisión. A) Adaptación. Una cepa priónica se adapta al cambiar de hospedador, adquiriendo propiedades bioquímicas y biológicas que pueden mantenerse (cepa morada en la parte inferior) o que pueden desaparecer (recuperación de la cepa verde en la parte inferior) al volver al hospedador original. B) Selección. A partir de una mezcla de conformeros inicial, la propagación en diferentes hospedadores altera las proporciones revelando subtipos antes minoritarios.

INTRODUCCIÓN

COMPETICIÓN

En algunos estudios experimentales se ha comprobado que el periodo de incubación de ciertas cepas puede extenderse al ser coinoculadas con otra. Así, cepas con largos periodos de incubación tienden a retrasar la aparición de signos causados por cepas más rápidas. Un ejemplo de este fenómeno en el cual dos cepas “compiten” ha sido observado al coinocular las cepas 22A y 22C en ratón (238, 239), siendo la primera más lenta que la segunda (aparición de los signos 550 días post inoculación, dpi, y 230 dpi, respectivamente). Cuando se inoculaban en conjunto, los efectos de 22C quedaban enmascarados por 22A, lo que sugería que ambas cepas compiten por propagar, con predominancia en este caso de 22A en detrimento de 22C que podría ser degradado o excretados más fácilmente.

En hámster, se observa un efecto similar al coinocular las cepas HY y DY (240), cuando se inocularon primero DY y posteriormente HY por vía intraperitoneal, retrasándose el período de incubación en animales tratados previamente con DY respecto al grupo control. Cuando ambas cepas se inoculaban vía intranerviosa, no se observaban diferencias por lo que parecía que esta competencia solo ocurría a nivel periférico, sugiriendo un tropismo mayor de una de las cepas para la propagación periférica.

Estos casos también indican que, a la hora de evaluar la posible competencia entre cepas, es importante tener en cuenta una serie de parámetros como cuándo se inoculan ambas cepas (a la vez o espaciadas en el tiempo), la dosis, las cepas en concreto que se están utilizando o la ruta por la cual se inoculan.

4.3 Efecto de los cofactores en la formación y selección de cepas priónicas

Diferentes moléculas parecen poder influenciar la formación y propagación de priones y cada vez existe una evidencia más firme que sugiere que estas moléculas o cofactores podrían contribuir a la diversidad de las cepas. De hecho, la distribución heterogénea de cofactores en el encéfalo también se baraja como posible explicación para el tropismo que muestran las distintas cepas por áreas encefálicas específicas (241). Sin embargo, para el análisis en profundidad del efecto de los diferentes cofactores, los estudios *in vivo* son tremendamente tediosos, por lo que suelen ser abordados mediante ensayos de propagación en sistemas *in vitro*.

De esta manera, utilizando técnicas para el estudio *in vitro* como la amplificación cíclica de proteínas malplegadas (PMCA, del inglés *Protein Misfolding Cyclic Amplification*), que replica de manera fiable y acelerada la conversión de PrP^C a PrP^{Sc}, se ha podido evaluar el efecto de cofactores aislados en el malplegamiento proteico. Mediante el uso de proteínas PrP recombinantes como sustrato (rPrP), se consiguió material malplegado en presencia de 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilglicerol (POPG), un fosfolípido aniónico sintético, y ARN purificado de hígado murino (57). Este material malplegado presentaba características similares a la PrP^{Sc} procedente de aislados de encéfalo, como la presencia

de un núcleo C-terminal resistente a la digestión con PK, de menor tamaño respecto a la PrP de mamífero debido a la ausencia de modificaciones postraduccionales (carece de anclaje a membrana por GPI y de glucosilaciones), pero altamente resistente igual (57). La inoculación de este material en ratón provocaba la aparición de signos típicos de una enfermedad priónica y el análisis posterior del encéfalo revelaba depósitos de PrP, vacuolización y presencia de PrP^{Sc} en altas cantidades (57). Era la primera vez que se conseguía material infeccioso *in vitro* utilizando rPrP y ponía en evidencia la importancia de los cofactores en el proceso de conversión, ya que, de hecho, las fibras de rPrP obtenidas de forma similar en ausencia de cofactores resultaron carentes por completo de infectividad (242).

Estos datos supusieron el inicio de un nuevo campo de estudio relacionado con la idea de que los cofactores podían afectar el malplegamiento, a conformación espacial de la PrP^{Sc} y, en consecuencia, las características de la cepa priónica resultante. El papel selector (si consideramos el inóculo original como una posible mezcla de cepas en lugar de una cepa pura) o modificador de los cofactores se puso en evidencia cuando tres semillas diferentes procedentes de encéfalo de ratón fueron usadas como semillas en PMCA con fosfatidiletanolamina (PE) como único cofactor (56, 243). Los inóculos originales presentaban diferente perfil de lesiones y de deposición de PrP^{Sc} en el cerebro. Sin embargo, tras la amplificación *in vitro* con PE como cofactor, la inoculación en ratón daba un resultado homogéneo e indistinguible: los tres inóculos habían convergido hacia una única cepa con el mismo período de incubación, neuropatología y propiedades bioquímicas que eran mantenidas *in vivo* (56).

Que los cofactores afectaban a la estructura durante el proceso de conversión quedó refutado mediante espectrometría de masas de intercambio de deuterio (DXMS, del inglés *deuterium exchange mass spectrometry*). El análisis de la conversión en presencia de POPG y ARN mediante DXMS reveló que el POPG se une a las tres hélices α de la rPrP y que el ARN interactuaba con el extremo N-terminal libre, afectando a la reorganización espacial ya que inicia una serie de cambios conformacionales que resultan en la obtención de priones infecciosos *in vivo* (244).

El papel selector de los cofactores a partir de una mezcla inicial de cepas es más evidente cuando se utilizan diferentes moléculas que puedan ejercer como tamiz de un mismo inóculo inicial. En el trabajo de Fernández-Borges y colaboradores (245), a partir de una cepa obtenida en PMCA (que contenía homogenizado de encéfalo como fuente de una mezcla compleja de cofactores) e infectiva *in vivo*, se realizaron diferentes amplificaciones del inóculo recombinante mediante PMCA con rPrP de topillo rojo y un solo cofactor cada vez: dextrano, ARN y plásmido (como ejemplo de ADN); así como en ausencia de cofactores. El material resultante de las diferentes amplificaciones fue utilizado para inocular ratones recombinantes que expresaban la PrP de topillo rojo (con secuencia aminoacídica idéntica a los inóculos utilizados). Los resultados eran muy variables y dependientes del tipo de cofactor empleado, presentando diferentes períodos de incubación, perfil de lesiones, depósitos de PrP y movilidad electroforética, siendo la menos infectiva la obtenida en ausencia de

INTRODUCCIÓN

cofactores (245). Las diferentes cepas obtenidas en presencia de cada cofactor podrían estar presentes en el inóculo original en proporción variable y la presencia del cofactor favorecería la propagación de cada una de ellas de manera preferencial en un proceso de selección, entendiendo así el inóculo original (obtenido con homogeneizado de cerebro y, por lo tanto, con una alta diversidad de cofactores) como una mezcla de cepas priónicas que ha sido “tamizado” al ser propagado en entornos con un solo cofactor (que solo permitiría la propagación de una o pocas cepas de la mezcla inicial). Alternativamente, cada cofactor podría haber inducido una adaptación específica de la semilla original, dando lugar a nuevos confórmeros con distintas propiedades, determinadas por cada cofactor utilizado.

Y es que parece que la presencia de cofactores puede ser en ocasiones imprescindible para el mantenimiento de las características de la cepa. Incluso se sugiere que la presencia de cofactores es necesaria para la producción de priones *in vitro* que presenten después niveles relevantes de infectividad (246). Este es el caso de los priones generados con PE que, en ausencia del cofactor, mostraban cambios en el patrón electroforético y perdían la capacidad infectiva (56, 246).

Estos estudios demuestran que los cofactores pueden afectar a las propiedades de las cepas *in vitro* y que estos cambios son transmisibles en la infección en modelos animales, pero aún queda por determinar cómo los cofactores celulares regulan la aparición de fenotipos específicos (signos, tropismo, patrón de lesiones) de cepa *in vivo*.

La idea de que los cofactores podrían ejercer efectos similares *in vivo* resulta del análisis del papel del heparán sulfato (HS), un glucosaminoglucano de carácter polianiónico naturalmente presente en el encéfalo, en diferentes cepas priónicas (247). El estudio, realizado con cepas que presentan fibras visibles mediante microscopía electrónica de transmisión (priones fibrilares) y cepas que carecen de estas fibras (priones subfibrilares), revelaba que el HS tendía a unirse a los priones fibrilares favoreciendo y formando parte a su vez de depósitos de PrP en regiones ricas en HS tanto en modelos animales de ratón como en pacientes con EET (247, 248, 249).

4.4 Efecto de los polimorfismos en la propagación de cepas priónicas

Aparte del claro efecto que tiene los cofactores en la generación *in vitro*, así como en la adaptación y selección de cepas priónicas, es importante tener en cuenta el genotipo del hospedador en términos de secuencia de PrP. Aunque esta está altamente conservada en las distintas especies de mamífero, presenta variantes alélicas incluso en una misma especie, basadas en polimorfismos que pueden afectar a la propagación y, en consecuencia, al tipo de cepa priónica resultante.

El efecto de los polimorfismos de la PrP en el fenómeno de cepas priónicas fue indirectamente descrito mucho antes de que la hipótesis de “solo proteína” se planteara (213), cuando las diferencias fenotípicas entre las variantes *drowsy* y *scratchy* de la oveja se achacaron a diferencias en el genotipo del hospedador (250). Asociados a estos polimorfismos se identificó el “gen del periodo de

incubación de *scrapie*" (*sinc*) cuyos polimorfismos estaban relacionados con los diferentes fenotipos (251). Más tarde se descubriría que este es en realidad el gen de la PrP, que la versión malplegada de esta proteína era el agente causal de las EET y que los polimorfismos identificados suponían cambios aminoacídicos importantes en las posiciones 108 y 189 la PrP murina (252), donde se habían identificado dos grupos polimórficos en base a este gen: *sinc*^{S7} y *sinc*^{P7}, que fueron rebautizados como *prnp*^a y *prnp*^b (216). A estos dos grupos se le sumó un tercero (*prnp*^c) identificado más tarde (253). La transmisión de priones procedentes del ganado ovino y vacuno a ambos grupos dio lugar a la aparición de una gran diversidad de cepas priónicas (215, 254), demostrando el efecto que tienen los polimorfismos en relación con la propagación de cepas distintas.

Pero la presencia de polimorfismos no es exclusiva de ratones, sino que ha sido descrita en casi todas las especies de mamíferos estudiadas. En ovejas, se han realizado un gran número de cruces buscando optimizar la calidad y la productividad del ganado, lo que ha provocado la aparición de un amplio rango de polimorfismos en el gen *PRNP* (255). Sin embargo, solo cinco alelos se han estudiado en mayor profundidad y que son los que más se contemplan en relación con las enfermedades priónicas, resultando en quince posibles genotipos diferentes que pueden favorecer o dificultar la transmisión de cepas diferentes de *scrapie* (255). Estos cinco alelos están basados en cambios en los codones 136, 154 y 171 y suelen designarse con los aminoácidos presentes en estas posiciones: ARQ, ARR, AHQ, ARH, VRQ... Se han descrito una gran cantidad de cepas diferentes de *scrapie* en base tanto a sus características biológicas como bioquímicas. Curiosamente, los alelos que tienden a favorecer la propagación de ciertas cepas, suelen dificultar la propagación de otras y viceversa. Mientras que parece haber un consenso en que los animales portadores del alelo VRQ son más susceptibles de infectarse con cepas clásicas de *scrapie*, este genotipo parece aumentar la resistencia a las llamadas cepas atípicas, mientras que la presencia de arginina (R) en la posición 171, como en el caso de los animales ARR, tiene el efecto contrario (256, 257) Existe, sin embargo, cierta superposición en la susceptibilidad presentada por los diferentes genotipos. Así, se han podido encontrar coexistiendo cepas clásicas y atípicas en ovejas ARQ/ARQ (258). Recientemente se ha descrito una nueva cepa de *scrapie* que ha sido nombrada como Nor98 (45) y que aparece sobre todo en animales con genotipos AHQ/AHQ y AHQ/ARQ (215, 259).

En humanos, el principal polimorfismo relevante para la transmisión de las EET lo podemos encontrar en el codón 129 en el que puede haber una metionina (M) o una valina (V). Hay una larga lista de evidencias que indican que este polimorfismo por sí solo o en conjunto con otras mutaciones en el gen *PRNP* modula la susceptibilidad a las enfermedades priónicas humanas, así como la manifestación fenotípica. Las diferentes cepas humanas de CJD están relacionadas con el origen (esporádico, genético o adquirido) y el polimorfismo en 129 de los individuos afectados entre otros, y tienen un patrón de bandas en WB claramente distinguible por la movilidad electroforética y la proporción de PrP no glucosilada, monoglucosilada y diglucosilada (224, 225, 227). Teniendo en cuenta estas características se han realizado diferentes clasificaciones (260, 261, 262). De manera general se pueden encontrar cuatro patrones electroforéticos clásicos (con tres bandas,

INTRODUCCIÓN

correspondientes a la PrP en sus tres posibles estados de glucosilación) combinados con los diferentes genotipos en el codon 129 (Figura 7). Es interesante remarcar cómo los de tipo 1 (con una banda no glucosilada de 21 kDa) y de tipo 2 (de 19 kDa) (226, 262) están asociados a variantes esporádicas de CJD (sCJD), pudiendo incluso coexistir en el mismo paciente (234, 263, 264, 265), mientras el tipo 3 se asocia a CJD iatrogénico y al Kuru, y el tipo 4 es exclusivo de la variante de CJD (vCJD), contraído al consumir productos cárnicos contaminados con BSE (266). Este último caso es especialmente importante, ya que el vCJD es el único que presenta un ratio en las glucoformas de la PrP con una marcada predominancia de la forma diglucosilada, muy similar al patrón del BSE original y claramente distinguible del resto de patrones (267).

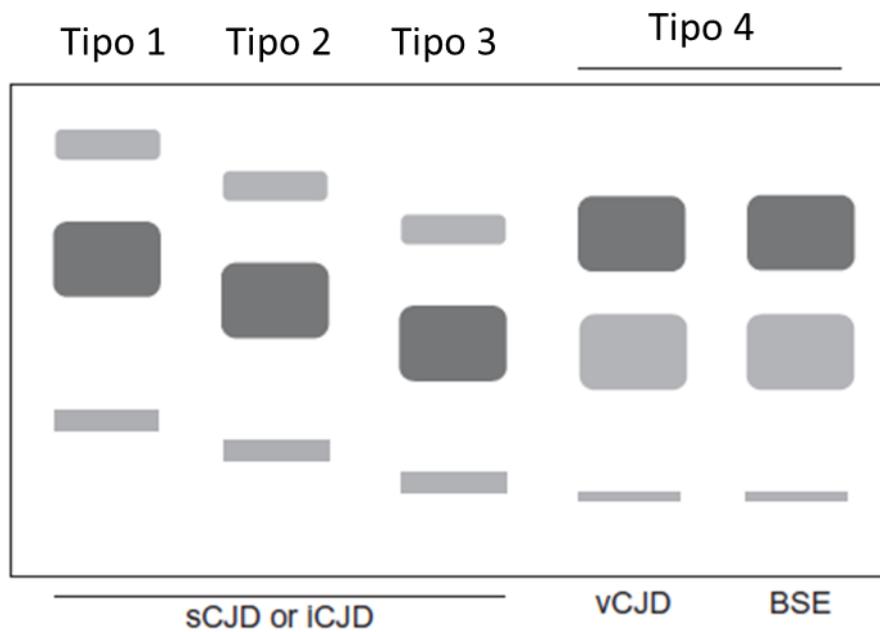


Figura 7. Representación esquemática de los patrones de movilidad electroforética de las diferentes cepas de priones humanos. Los diferentes priones humanos se diferencian en función de su movilidad electroforética en *Western blot* tras digestión con proteasas y al patrón y proporción de las diferentes isoformas (di, mono o no glucosilada) de la PrP. Las cepas vCJD y BSE comparten el mismo patrón ya que uno deriva del otro (modificado de Marín-Moreno 2017).

4.5 Cepas atípicas

Las cepas priónicas descritas hasta ahora son las concidas como como cepas clásicas. Caracterizadas por un núcleo resistente a proteasas de 27-30 kDa y un patrón tribandeado (debido a la presencia de PrP no glucosilada, monoglucosilada y diglucosilada). Junto a estas cepas clásicas, tanto en humanos como en otras especies, se ha detectado la presencia de lo que se conoce como cepas atípicas, cuyo patrón observado en *Western blot* tras la digestión con proteasas difiere del clásico y cuya progresión de la enfermedad es habitualmente más lenta.

La existencia de una cepa atípica de *scrapie* fue descrita por primera vez en Noruega en 1998 (45, 268), de ahí que se haya nombrado como Nor98, aunque ha sido detectada en toda Europa (269, 270,

271, 272), América (273, 274), Nueva Zelanda (275) y Australia (276) posteriormente. A nivel histopatológico, los cambios espongiiformes y los depósitos de PrP^{Sc} se observan sobre todo en las zonas corticales y en el cerebelo, en lugar de en la *medulla oblongata* como es típico en las cepas clásicas (277). Además, la ausencia de depósitos intraneuronales (que sí están presentes en casos de cepas clásicas) ya indicaba una posible sensibilidad mayor a la digestión con proteasas (278). A nivel bioquímico, aparecen bandas no glucosiladas de pequeño tamaño (11-12 kDa) (268, 269, 278, 279), más sensibles a proteasas que las cepas clásicas (278) y que suelen aparecer acompañadas por una serie de bandas de mayor tamaño en una formación en escalera. A nivel de genotipo, las cepas de scrapie atípico son más frecuentes en ovejas con alelos resistentes a las cepas clásicas (280, 281).

En humanos, la descripción de cepas atípicas con patrones electroforéticos distintos y menor resistencia a la digestión con proteasas se ha realizado en casos de GSS y VPSPr. A nivel clínico, el GSS se diferenciaba fácilmente de otras prionopatías humanas por un curso generalmente más lento, menor cambio espongiiforme del tejido y mayor deposición de amiloides (282). Estas diferencias también se manifiestan a nivel molecular: mientras que la digestión con proteasas en casos de CJD o IFF generan un núcleo C-terminal que retenía el anclaje a GPI, en casos de GSS la digestión de la PrP^{Sc} genera fragmentos no glucosilados carentes del anclaje a membrana que, de forma similar a las cepas atípicas de *scrapie*, se encuentra en formando agregados en espacio extracelular (283, 284). Los fragmentos de PrP^{Sc} obtenidos también presenta un pequeño tamaño de 7-8 kDa, carentes de los extremos amino y carboxiterminal (283, 284, 285, 286).

La descripción de VPSPr, donde fue necesario un tratamiento especial para obtener el patrón electroforético en escalera, mostraba bandas que variaban desde los 6 hasta los 29 kDa (46). Estos fragmentos presentan las mismas características bioquímicas que los observados en casos de GSS y estas similitudes entre ambas prionopatías se han tomado como el indicio de que la VPSPr podría ser la variante esporádica del GSS, de origen genético (6, 287).

4.6 Importancia del fenómeno de cepas priónicas: barrera de transmisión

Como ha quedado patente tanto en ganado ovino como en otras especies, la presencia de polimorfismos puede afectar a la susceptibilidad y a la transmisión de las diferentes cepas priónicas. Esta dificultad para transmitir cepas que deben adaptarse al nuevo entorno o que no consiguen propagar en este, se ha definido como barrera de transmisión.

La capacidad de los priones de transmitirse entre diferentes especies es un hecho que se puso en evidencia casi desde el comienzo del estudio de estas enfermedades, cuando se infectó de manera experimental a chimpancés con priones provenientes de personas afectadas de Kuru (30). Esta misma capacidad para saltar entre especies quedó patente durante la crisis alimentaria de principios de los 90, con la transmisión de BSE a seres humanos, causando la variante de la CJD (288). Sin

INTRODUCCIÓN

embargo, esta transmisión interespecífica está restringida, ya que algunas cepas presentan cierta dificultad para transmitirse, lo que provoca tasas de ataque incompletas (no todos los animales inoculados desarrollan la enfermedad) (289, 290) y/o prolongación en los tiempos de incubación (250, 291, 292). En ambos casos, se da replicación del prion infeccioso durante la fase asintomática (293, 294), pero en ocasiones, la acumulación de PrP patogénica no alcanza la concentración necesaria como para generar signos clínicos de la enfermedad (238).

La presencia de esta barrera de transmisión se ha atribuido a la acumulación de un conjunto de factores, como la eficiencia de conversión de una determinada PrP^C por una cepa particular o la patología causada por la cepa en cuestión (295). Sin embargo, parecía que las alteraciones en la eficiencia de conversión (e incluso la ausencia de conversión) estaban en realidad causadas por diferencias entre las secuencias aminoacídicas de las PrP donante y receptora. (159). Por ejemplo, la barrera de transmisión entre hámster o visón y el ratón desaparece cuando se produce una expresión heteróloga de la PrP del donante (hámster o visón) en el ratón (289, 296). La barrera de transmisión entre hámster y ratón es una de las más claras y estudiadas, y un claro ejemplo de la importancia de la secuencia de la PrP donante y receptora. No obstante, la transmisión de priones no es simétrica, es decir, no tiene por qué darse con la misma facilidad en ambos sentidos. Es el caso de algunas cepas de priones murinos, que impiden la formación de amiloides en PrP de hámster, lo que no ocurre en el proceso inverso (297). La propagación preferencial de los priones sobre PrP^C de secuencia idéntica, en el caso del hámster y el ratón, también se ha estudiado mediante ratones transgénicos que coexpresaban PrP murina y de hámster. Cuando estos ratones eran infectados con priones de ratón, los agregados estaban compuestos casi en su totalidad por PrP^{Sc} murina, mientras que cuando se infectaban con priones de hámster, los agregados estaban compuestos mayoritariamente por PrP^{Sc} de hámster (159).

Pese a que la barrera de transmisión entre especies es un hecho evidente y se habló de “barrera de especies” como concepto, realmente la barrera de transmisión puede ocurrir incluso intraespecie debido a alteraciones en la secuencia de aminoácidos, es decir, a polimorfismos presentes en la PrP. Esto queda patente en estudios realizados con ratones de genotipo a y genotipo b, cuyas PrP difieren tan solo en dos residuos aminoacídicos, lo que es suficiente como para que manifiesten tiempos de incubación dispares en función de la cepa priónica con la que se les inocule (298). Algo similar ocurre en las enfermedades priónicas en ovejas, cuyos polimorfismos, como ya se ha comentado, determinan una mayor o menor susceptibilidad a determinadas cepas de *scrapie* (299). Y es que este parece ser el punto clave, la combinación entre cepa priónica y secuencia de aminoácidos de la PrP receptora. La diferencia de secuencia entre la PrP donante y receptora debe contribuir a la de la barrera de transmisión determinando la interacción entre ambas proteínas. Pero también esta secuencia determina el rango de confórmeros posibles que puede adquirir la proteína (4, 173, 300) y la estabilidad con la que este confórmero se replica (301). Así, una cepa priónica puede transmitirse si tiene capacidad para interactuar con la PrP receptora y si esta, a su vez, con su propia secuencia de aminoácidos, es capaz de replicar de manera eficiente la configuración espacial que le impone el

prion. El concepto de esta barrera de replicación conformacional en la transmisión interespecie también explicaría el hecho de que la transmisión suele estar acompañada de cambios en la cepa priónica (295, 302), que podrían explicarse mediante un proceso de adaptación o podría ser un reflejo de la selección de una cepa compatible procedente de una mezcla inicial en el inóculo (250).

Pese a que la secuencia aminoacídica y la estructura tridimensional parecen ser los principales responsables de la barrera de transmisión, cabe destacar que se han sugerido otros componentes involucrados. Este sería el caso de los cofactores de interacción, que intervendrían en la eficiencia de propagación, si bien aún no han sido caracterizados (303).

4.7 Mezcla de cepas priónicas: cuasiespecies y el modelo de cambio conformacional

La posibilidad de que las cepas priónicas en realidad sean una mezcla de confórmeros, de diferentes PrP^{Sc} malplegadas en proporciones variables y que, en conjunto, resulten en la cepa en cuestión, parece quedar respaldado por diferentes experimentos *in vitro* (304, 305, 306). Estos datos sugieren que los priones podrían actuar como cuasiespecies. Las cuasiespecies son definidas en los virus como una población de partículas víricas similares pero no iguales entre sí que son consecuencia de una alta tasa de mutación en el genoma del virus (307, 308). De manera similar, las cuasiespecies priónicas serían similares entre sí pero no iguales, y presentarían alteraciones no en la secuencia de aminoácidos, sino en la estructura tridimensional (173, 304). Aunque este aspecto es interesante y tiene respaldo experimental, aún se conoce muy poco de la posible capacidad de “mutar”, entendido como la posibilidad de alterar la conformación tridimensional de un prion, así como de la de la distribución de posibles confórmeros de la PrP^{Sc} (309, 310).

En relación con el concepto de cepas priónicas como población de cuasiespecies y para explicar cómo la PrP^C del hospedador afecta a la propagación de la cepa y sus características, se ha propuesto el modelo de selección conformacional. En este modelo se concibe la cepa priónica como una nube de posibles confórmeros de PrP^{Sc} (que puede tener cuasiespecies de PrP^{Sc} más predominantes que otras en la mezcla) y que la transmisión a un nuevo hospedador o la propagación a expensas de PrP^C heteróloga quedaría determinada por el rango de confórmeros de PrP^{Sc} del que está compuesta la cepa en cuestión y las restricciones conformacionales impuestas por la secuencia y la conformación de la PrP^C a malplegar (173, 206). De acuerdo con este modelo, dependiendo de las propiedades de la PrP^C y de los confórmeros en el inóculo, cada especie (y cada secuencia de PrP concreta, teniendo en cuenta también los polimorfismos) podría ser infectado por un rango de posibles PrP^{Sc}. De esta manera, la composición relativa de las cuasiespecies presentes en la cepa original podría no mantenerse tras la transmisión a otra especie o secuencia de PrP receptora, lo que resultaría en la aparición de una nueva cepa (siendo esta también una nube de confórmeros, pero en una proporción diferente de la original). Además, la aparición de esta nueva cepa también podría surgir como resultado de la imposibilidad de la PrP^C receptora de replicar la estructura de ciertas cuasiespecies

INTRODUCCIÓN

presentes en el inóculo original, incluso de la mayoritaria, lo que provocaría que un subgrupo de confórmeros fueran favorecidos durante la propagación (173, 206).

Pese a las evidencias que apoyan la teoría de las cuasiespecies, los mecanismos moleculares que subyacen a la posibilidad de que se produzcan y mantengan un rango de confórmeros son aún desconocidos, y las implicaciones de que las cepas sean en realidad una mezcla de estos en relación con la biología de las enfermedades priónicas apenas está comenzando a conocerse.

5. Estudio de propagación de cepas priónicas *in vitro*: sistemas de propagación de priones

El estudio de todas estas propiedades y características se hace especialmente difícil *in vivo*, sobre todo debido a los largos períodos de incubación, a la necesidad de amplias instalaciones adaptadas al mantenimiento de animales y a la complejidad de estudiar organismos completos. Si bien se ha intentado simplificar y acelerar el proceso mediante el uso de ratones transgénicos que sobreexpresan PrP (murina o de otras especies), realmente uno de los mayores avances en el modelado de las EET se ha dado gracias a la posibilidad de utilizar sistemas de propagación de priones *in vitro*. Estos sistemas buscan mimetizar de manera fiable y controlada la conversión priónica que tiene lugar *in vivo* con el objetivo de estudiar en detalle la naturaleza del agente infeccioso, reduciendo el coste y el tiempo que serían necesarios de estar trabajando con modelos animales.

Los principales sistemas utilizados para el estudio de propagación de priones sin el uso de animales son el sistema de propagación *in cellula*, además de los diferentes sistemas de propagación *in vitro*: el ensayo de conversión libre de células, la conversión inducida por agitación o QuIC (del inglés, *Quaking Induced Conversion*), la PMCA y, la más reciente, la PMSA que es la principal técnica empleada en esta tesis doctoral.

5.1 Sistemas de propagación *in cellula*

La obtención de líneas celulares que fueran capaces de mantener la propagación de priones ha sido esencial para describir mecanismos relacionados con la propagación y neurotoxicidad de la PrP^{Sc} (311). El uso de líneas celulares es más rápido y permite estudiar en más detalle procesos celulares que el uso de animales y, además, conserva ciertas semejanzas con estos, a diferencia de los sistemas *in vitro*, ya que mantienen la integridad de las estructuras celulares, las modificaciones postraduccionales propias de la PrP^C y su localización subcelular y las interacciones entre células. Esto permite estudios que son imposibles de realizar en sistemas *in vitro*, como los relacionados con las alteraciones en la expresión, degradación y localización de la PrP^C o con los mecanismos de toxicidad.

Pese a la clara utilidad de estos sistemas, presentan ciertas desventajas, como la imposibilidad de propagar un gran número de cepas (311) y, a día de hoy, no existe ninguna explicación para el hecho de que ciertas líneas sean susceptibles a la infección solo por parte de determinadas cepas priónicas (312). No obstante, este hecho limita en gran medida su uso para estudios relacionados con los fenómenos de cepa o la barrera de transmisión.

5.2 Ensayo de conversión libre de células

El primer sistema *in vitro* desarrollado que mimetiza el proceso de conversión fue desarrollado por Caughey y colaboradores y se basa en el uso de las dos isoformas de la PrP purificadas a partir de encéfalos: PrP^C y PrP^{Sc}. Tras desnaturalizar la PrP^{Sc} mediante el uso de agentes caotrópicos, se permitía su renaturalización diluyendo el agente desnaturalizante. La PrP^{Sc} renaturalizada mantenía la capacidad de inducir un cambio conformacional en la PrP^C (marcada radiactivamente para facilitar su detección) (313).

Este sistema permitió identificar factores que afectan al proceso de conversión y entender mejor la barrera de transmisión (314). La principal aportación del ensayo libre de células ha sido la demostración de que la PrP^{Sc} tiene la capacidad de alterar la estructura de la PrP^C, induciendo su malplegamiento sin la interacción de ningún otro componente, refutando la hipótesis de “solo proteína”.

Sin embargo, el bajo rendimiento de conversión, así como las condiciones no fisiológicas y las grandes cantidades de PrP^{Sc} necesarias para iniciar la propagación han dificultado la evaluación de la infectividad *in vitro* mediante este sistema.

5.3 PMCA

Una vez demostrada la capacidad de la PrP^{Sc} para inducir el malplegamiento de la PrP^C *in vitro*, se buscaron otros sistemas que pudieran mejorar el rendimiento respecto a la conversión libre de células. Esta mejora vendría dada por la incorporación de sonicación al sistema, lo que permitiría la conversión de grandes cantidades de PrP^C a PrP^{Sc} partiendo de cantidades ínfimas de inóculo (315). De manera análoga a la PCR (reacción en cadena de la polimerasa, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) donde se suceden varios ciclos de amplificación a partir de una hebra de ADN molde, esta nueva técnica buscaría la propagación de amiloides en varios ciclos de sonicación para amplificar la señal a partir de una semilla de PrP^{Sc} inicial. Por este carácter cíclico, se denominó amplificación cíclica de proteínas malplegadas o PMCA (del inglés, *Protein Misfolding Cyclic Amplification*).

Aunque inicialmente la PMCA fue desarrollada para ser realizada manualmente, pronto se actualizó a una versión automatizada con el fin de aumentar la sensibilidad, la especificidad y el rendimiento (51, 316, 317, 318). La técnica se basa en la repetición constante de un ciclo formado por dos fases.

INTRODUCCIÓN

En la primera, una pequeña cantidad de PrP^{Sc} es incubada en presencia de PrP^C, lo que presumiblemente promueve la unión y la formación de agregados de PrP^{Sc}. Durante la segunda, tras acabar la incubación, la muestra se somete a ultrasonidos con el objetivo de disgregar los agregados, lo que favorece la aparición de núcleos de crecimiento que crecerán durante la siguiente fase de incubación. Con los sucesivos ciclos de sonicación e incubación se consigue amplificar la semilla original, obteniéndose una cantidad de PrP^{Sc} mayor que la inicial (316). De esta manera, cantidades de PrP^{Sc} indetectables inicialmente por métodos bioquímicos (como el *Western blot*) consiguen amplificar su señal y resultar detectables con facilidad.

El mecanismo molecular subyacente al proceso por el cual ocurre la conversión *in vitro* sigue siendo desconocido. Se ha sugerido que la primera fase de latencia podría ser el evento más importante del proceso, ya que la nucleación es un proceso fácil de inhibir o alterar por distintos factores físico-químicos: semillas homólogas o heterólogas, temperatura, concentración de PrP^C o inhibidores de la nucleación, entre otros.

La técnica fue concebida como herramienta de diagnóstico, de forma que, partiendo de una fuente de PrP^C como sustrato (procedente de homogeneizados de cerebro (319) o extractos de células (320, 321) y una semilla con PrP^{Sc}, pudiera amplificar la señal hasta hacerla detectable a expensas de la conversión de PrP^C del sustrato en PrP^{Sc}. De esta manera, se han conseguido detectar priones no solo en cerebros de animales con EET, sino en tejidos periféricos como la amígdala o el bazo (322), y fluidos biológicos como la sangre (323), la orina (324) o el líquido cefalorraquídeo (CSF, del inglés, *cerebro spinal fluid*) (325). La posible aplicación en clínica para el diagnóstico sigue planteándose a día de hoy, ya que gracias a la PMCA se han podido detectar priones en sangre no solo en animales con signos, sino también en presintomáticos (317, 326). Sin embargo, la importancia de la PMCA radica en su capacidad para mimetizar *in vitro* algunos de los procesos implicados en la replicación de priones *in vivo*. Así, es una técnica de gran utilidad por su capacidad para replicar eficientemente diversas cepas priónicas infecciosas de diferentes especies, manteniendo sus características (327), reproduciendo también gran parte de los fenómenos de barrera de transmisión y adaptación que se observan cuando se estudian las cepas priónicas *in vivo* (52).

Además, esta técnica fue mejorada al poderse hacer de forma seriada, es decir, utilizando una parte del producto de una PMCA para inocular sustrato fresco en una nueva reacción (51). La combinación de la PMCA seriada con la detección mediante WB disminuyó la cantidad mínima de PrP^{Sc} detectable de 6-12 pg a 1 ag, teniendo la misma sensibilidad que los bioensayos más sensibles con animales (322).

Debido a las limitaciones que supone obtener sustrato a partir de homogeneizados de cerebro, se han propuesto fuentes alternativas de PrP^C, como PrP de plaquetas (328), cultivos celulares (320) y la alternativa más popular: PrP recombinante (329). Esta PrP es expresada en *Escherichia coli* y, al ser producida en un organismo procariota, presenta dos grandes diferencias con respecto a la PrP de mamífero: carece de glicosilaciones y tampoco presenta la secuencia C-terminal con el anclaje a GPI.

Pese a estas diferencias, la PrP recombinante ha sido utilizada con éxito en PMCA para generar priones con infectividad *in vivo* (330). Sin embargo, el material malplegado obtenido con material recombinante presenta una infectividad limitada (330), ya que no todas las PrP recombinantes malplegadas *in vitro* en una isoforma resistente a la digestión con proteasas resultan ser tan infecciosas cuando se inoculan *in vivo*: muchas son no infecciosas o presentan infectividad tras varios pases en animales.

La PMCA también permite la generación espontánea de priones, es decir, en ausencia de semilla. Estos priones generados *de novo* han sido obtenidos tanto con PrP de mamífero (327, 331) como con PrP recombinante (57, 332), siendo estos infecciosos en modelos animales. En el caso de la generación de priones recombinantes, parece haber cierta relación entre los cofactores utilizados en el proceso de generación espontánea y la infectividad del material resultante, siendo más probable la obtención de material infeccioso en presencia de determinados cofactores, como es el caso de los priones recombinantes obtenidos con ARN y lípidos (57, 332), respecto a los obtenidos en ausencia de cofactores, solo en presencia de sales y detergentes (330). Los cofactores, pues, parecen actuar como un tamiz o selector durante la propagación, si bien en procesos de malplegamiento espontáneo podrían dirigir o restringir el malplegamiento hacia un rango de conformaciones determinado.

Con este proceso como base se han realizado diferentes modificaciones y adaptaciones que van desde la actualización del material y de los equipos por unos más sofisticados y eficientes, hasta la adición de nuevos componentes a la mezcla inicial de reacción.

5.4 Conversión inducida por agitación o QuIC

Uno de las técnicas derivadas de la PMCA fue la conversión inducida por agitación o QuIC (del inglés, *Quaking Induced Conversion*). Este método fue desarrollado en 2008 por el laboratorio de Byron Caughey (333) y rápidamente se convirtió en uno de los métodos más populares para el malplegamiento de priones *in vitro* debido a su mayor rapidez en comparación con la PMCA y a la sustitución de la sonicación por agitación, simplificando el proceso.

El QuIC se ha podido semiautomatizar utilizando placas de 96 pocillos y permite una monitorización de la formación de fibras amiloides en tiempo real (RT-QuIC) mediante la adición de tioflavina T (ThT, del inglés, *Thioflavine T*) que se une específicamente a agregados amiloides y emite fluorescencia fácilmente detectable (334, 335). La formación de amiloides en RT-QuIC suele constar de una fase de latencia (donde la fluorescencia detectada es residual) seguida por un crecimiento exponencial hasta una fase de estabilización (en el caso de que la semilla utilizada contenga PrP^{Sc} capaz de inducir el malplegamiento). El desarrollo del RT-QuIC ha sido de gran utilidad, sobre todo para la detección fácil y rápida de PrP^{Sc} en muestras de líquido cefalorraquídeo (336, 337), raspados nasales (338), orina (339), heces (340) y saliva (341). La alta sensibilidad y especificidad que ha mostrado para la detección de priones en CSF procedente de pacientes con CJD esporádico (338) y en muestras de

INTRODUCCIÓN

raspado nasal procedentes de pacientes con IFF y CJD esporádico (338, 342), han hecho del QuIC una gran candidata para el diagnóstico de EET en la práctica clínica, cuyo uso se está generalizando rápidamente.

La primera generación de RT-QuIC utilizaba PrP recombinante de hámster (334) o PrP recombinante humana 129M (343). Si bien se ha postulado el uso de la PrP recombinante del topillo rojo americano como sustrato universal, la alta tendencia a formar agregados sin semilla ha hecho que se haya descartado en clínica por el miedo a los falsos positivos (321). Por lo que la mejora en la segunda generación de RT-QuIC ha consistido en ligeras variaciones de las condiciones de reacción y el uso de una PrP de hámster truncada (carece de los primeros 90 aminoácidos), lo que ha resultado en un incremento de la sensibilidad sin reducción de la especificidad (344).

Además de la clara utilidad del QuIC en el diagnóstico tanto en humanos (343, 338) como en animales (345), también se ha utilizado para la diferenciación de cepas priónicas (346). Sin embargo, presenta una gran desventaja frente a la PMCA: la incapacidad para producir priones infecciosos, lo que limita su utilidad (333, 347). Estos agregados amiloides de PrP obtenidos carecen de infectividad *in vivo*, lo que debe suponer diferencias estructurales con priones *bona fide*. Precisamente por tratarse de amiloides no priónicos, RT-QuIC no es un sistema útil para el análisis del fenómeno de barrera ni para estabilización de cepas de manera fiable.

5.5 PMSA

La más reciente modificación de la PMCA, también sustituye la sonicación por la agitación presente en el QuIC, con el objetivo de combinar las ventajas de ambas estrategias: la facilidad de la agitación respecto a la sonicación presente en el QuIC y la obtención de priones *bona fide* de la PMCA. Esta nueva técnica ha sido nombrada como amplificación de proteínas malplegadas mediante agitación o PMSA (del inglés, *Protein Misfolding Shaking Amplification*) y surge como una opción para la generación *in vitro* de grandes cantidades de priones recombinantes que mantengan la infectividad (348).

Uno de los problemas de la PMCA es el desconocimiento de los eventos moleculares que ocurren en ella, lo que, combinado con el uso de homogeneizados de cerebro como sustrato, podría dar lugar a la generación de mezclas de cepas, que solo podrían ser separadas mediante el uso de sustratos con un único cofactor (245, 348). Esto, combinado con la agitación presente en RT-QuIC, mucho más reproducible, controlable y sencilla que la sonicación, permiten a la PMSA la formación de priones *bona fide* infecciosos. Además, la facilidad para escalar y obtener grandes cantidades de material malplegado y homogéneo en PMSA, facilita que se pueda estudiar este por técnicas como la resonancia magnética nuclear (RMN) de estado sólido (348).

La simpleza, reproducibilidad y fiabilidad, así como lo fácilmente escalable de esta técnica, han permitido la obtención de grandes cantidades de material infeccioso que, por otras técnicas, como la

PMCA, sería prácticamente imposible. También ha sido utilizada para el testado masivo de compuestos con posible actividad antiprionica (349) y para el estudio de posibles desinfectantes de superficies contaminadas con priones (350).

La PMSA parece ser pues una herramienta de gran utilidad para el estudio de cepas, ya que permite mantenerlas de manera estable manteniendo sus propiedades, y del efecto de los cofactores en estas cepas, así como en la generación espontánea de las mismas. El control que otorga sobre el entorno de propagación y los parámetros en los que ocurre, la hacen también de interés para el análisis de fenómenos como la barrera de transmisión.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis: La generación de distintas cepas recombinantes *in vitro* utilizando las mismas condiciones o variaciones en el sustrato de reacción es posible y permite estudiar los mecanismos moleculares que determinan la diversidad de las mismas y su estabilidad ante cambios en el entorno de propagación.

Objetivos

1. Generar utilizando distintas condiciones de reacción una variedad de proteínas recombinantes malplegadas *in vitro*.
 - 1.1. Determinar posibles diferencias en las proteínas malplegadas mediante su caracterización biológica.
 - 1.2. Determinar posibles diferencias en las proteínas malplegadas mediante su caracterización bioquímica.
2. Generar proteínas recombinantes malplegadas *in vitro* partiendo de distintos entornos de propagación
 - 2.1. Determinar posibles diferencias en las proteínas malplegadas mediante su caracterización bioquímica.
3. Analizar comparativamente las distintas proteínas malplegadas de acuerdo con sus características bioquímicas
4. Determinar la influencia de alteraciones en el entorno de propagación de las proteínas recombinantes malplegadas sobre sus características bioquímicas.
 - 4.1. Estudio del efecto de agentes caotrópicos en el entorno de propagación sobre las características bioquímicas de las cepas seleccionadas.
 - 4.2. Estudio del efecto de la ausencia de cofactor en el entorno de propagación sobre las características bioquímicas de las cepas seleccionadas.
5. Clasificar en función de las propiedades bioquímicas la diversidad de semillas originales y sus posibles variantes modificadas para establecer agrupaciones basadas en rasgos comunes.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Construcción de plásmidos de expresión de las PrP utilizadas

1.1 Generación de los plásmidos con PrP de topillo rojo 109I, ratón y oveja 112I

Para la producción de las PrP recombinantes de ratón, oveja y topillo rojo en *Escherichia coli* (*E. coli*) se utilizaron vectores plasmídicos especializados en la expresión de genes eucariotas, incorporados mediante genética molecular. En concreto, se han empleado los vectores pOPINE desarrollados por Oxford Protein Production Facility UK (OPPF), especialmente diseñados para su clonación mediante el sistema *In Fusion*, que permite una alta expresión de la proteína clonada (351). Los plásmidos pOPINE están basados en el vector pTriEX2, caracterizado por la resistencia al antibiótico ampicilina, la presencia de un potenciador híbrido de citomegalovirus (CMV), del promotor de β -actina que permite la expresión de proteínas eucariotas en bacterias *E. coli* y de una diana para la carboxipeptidasa A seguida de una cola de 6 histidinas, necesarias para la purificación de proteínas mediante el sistema de cromatografía de afinidad Níquel-Ácido Nitriloacético (Ni-NTA, del inglés *Niquel - Nitriloacetic Acid*).

El vector pOPINE se digirió con las enzimas de restricción NcoI y PmeI (New England Laboratories) siguiendo el protocolo de la OPPF (*A Guide to using the OPPF pOPIN Vector suite for HTP In-Fusion Cloning*). Tras su digestión, los fragmentos de ADN se separaron utilizando electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) (Thermo Scientific) y se visualizaron mediante tinción con RedSafe (iNtRON Biotechnology) según las especificaciones del fabricante. Por último, el vector linealizado de 5151 pares de bases (pb) se purificó mediante el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

Para la clonación de las diferentes secuencias de PrP en el vector pOPINE mediante el sistema *In Fusion*, los extremos de las secuencias de los ORF (del inglés, *Open Reading Frame*) de los genes de la PrP de topillo rojo con el polimorfismo 109I así como de las PrP de ratón 108L y de oveja con los polimorfismos 136A, 154R y 171Q, extraídas previamente de tejido encefálico utilizando el kit de extracción de ADN genómico NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel) se amplificaron y adecuaron a la recombinación homóloga mediante PCR, teniendo en cuenta las especificaciones señaladas en el protocolo de la OPPF. Este paso es crucial para la correcta clonación de las secuencias deseadas en el vector mediante el sistema *In Fusion*, ya que se basa en una recombinación homóloga entre los

MATERIALES Y MÉTODOS

extremos de la secuencia a clonar y el vector. Por ello, los oligonucleótidos diseñados para tal fin se hicieron coincidir en al menos 15 pb con los extremos del vector. Además, en el oligonucleótido del extremo C-terminal se introdujo un codón de terminación (TTA) en la posición de la lisina (K) inmediatamente anterior de la cola de histidinas con el fin de evitar el corte con carboxipeptidasa A tras la purificación. El uso de esta enzima sería imprescindible para la eliminación de la cola de 6 histidinas necesaria para la purificación de la proteína por columnas de afinidad Ni-NTA. Sin embargo, debido a la presencia de numerosas histidinas en la zona de octarrepeticiones de la PrP, la cola de histidinas no es necesaria para su purificación mediante este tipo de columnas de afinidad, cumpliendo la misma función que una cola de histidinas añadida artificialmente. Las secuencias 5' y 3' de los oligonucleótidos utilizados en las PCR son las siguientes:

- Oligonucleótido del extremo N-terminal para la PrP del topillo rojo 109I:

AGGAGATATACCATGAAGAAGCGGCCAAAGCCTGG

- Oligonucleótido del extremo C-terminal para la PrP del topillo rojo 109I:

GTGATGGTGATGTTAGGAACTTCTCCCTTCGTAGTA

- Oligonucleótido del extremo N-terminal para la PrP del ratón 108L:

AGGAGATATACCATGAAAAAGCGGCCAAAGCCTGAA

- Oligonucleótido del extremo C-terminal para la PrP del ratón 108L:

GTGATGGTGATGTTAGGATCTTCTCCCGTCGTAATA

- Oligonucleótido del extremo N-terminal para la PrP de oveja ARQ:

AGGAGATATACCATGAAGAAGCGACCAAAGCCTGG

- Oligonucleótido del extremo C-terminal para la PrP de oveja ARQ:

GTGATGGTGATGTTAACTTGCCCCCTTTGGTAATA

Utilizando como molde el ADN genómico de las especies indicadas anteriormente, se realizó una PCR con el fin de amplificar la secuencia de ADN de interés mediante los oligonucleótidos específicamente diseñados y mostrados en el párrafo anterior. Los reactivos presentes en las reacciones de PCR fueron: 2-10 ng de ADN genómico, 50 ng de cada uno de los oligonucleótidos (Sigma), 1.25 unidades *LongAmp™ Taq DNA Polymerase* (New England Biolabs), 10 µl 5X *LongAmp™ Taq Reaction Buffer* (New England Biolabs), 0,4 µl dNTP 10 mM (Sigma-Aldrich), H₂O desionizada (hasta alcanzar un volumen final de reacción de 50 µl, dependiendo de la concentración de ADN genómico). Las condiciones de PCR aplicadas fueron en primer lugar, un ciclo inicial de desnaturalización del molde de ADN de partida mediante calentamiento a 95 °C durante 5 min, a continuación, 35 ciclos de amplificación y finalmente, 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 PCR se empleó el termociclador *DNA Engine Peltier Thermal Cycler, PTC-200* (Bio-Rad).

Tras comprobar que el tamaño del fragmento amplificado era el correcto, se continuó con el protocolo descrito por la casa comercial y el producto de PCR se digirió con la enzima de restricción DpnI (New England Biolabs) para eliminar los fragmentos de ADN metilados procedentes del molde utilizado para la reacción. Las muestras digeridas se purificaron mediante el kit *QIAquick PCR purification* (Qiagen) siguiendo las especificaciones del fabricante.

Una vez obtenidos el vector y el fragmento para clonar linealizados, se procedió a las recombinaciones homólogas necesarias mediante el método de clonación In Fusion Dry-Down PCR Cloning Kit (Clontech), siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Para ello, se midieron las concentraciones de vector y fragmento linealizados utilizando un equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) con el objetivo de preparar una mezcla de ambos componentes en proporción molar 1:2 (vector:fragmento).

Finalmente, los vectores se transformaron en bacterias competentes *E. coli* DH5 XL-Gold® (Stratagene) siguiendo el protocolo estándar de transformación mediante choque térmico descrito por Inoue et al. (352). 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 kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Para verificar que los plásmidos purificados tenían incorporados los genes que codifican las PrP humana 129M, de topillo rojo 109I y de oveja ARQ se realizó un análisis de restricción de los plásmidos con la enzima de restricción Aval (New England Biolabs). Finalmente, con el fin de asegurar que los plásmidos obtenidos contenían las secuencias correctas, el gen de la PrP y los extremos adyacentes se secuenciaron completamente mediante el servicio de secuenciación de Stabvida empleando el oligonucleótido universal T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3').

1.2 Generación de los plásmidos con PrP de topillo rojo 109M, 109L, 109A, 109V, 109F, 112M y 109M 112M, y oveja ARQ 112I

A partir de las construcciones previas de PrP de topillo rojo 109I y de oveja ARQ, se han generado distintos plásmidos con la PrP de topillo rojo con los siguientes aminoácidos en la posición 109 (M,

MATERIALES Y MÉTODOS

L, A, V y F), en la posición 112 (la secuencia presenta isoleucina en esta posición de manera natural, de forma que se ha sustituido por una metionina). En la PrP de oveja ARQ, se ha variado también la posición 112, sustituyendo la metionina original por una isoleucina.

Para cada una de las diferentes variantes se diseñaron oligonucleótidos que incorporaban el cambio de secuencia correspondiente. El tamaño de estos oligonucleótidos se determinó según la secuencia adyacente a la base a sustituir (aproximadamente 15 pares de bases hacia el extremo 3' y 15 pares de bases hacia el extremo 5'). 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 del oligonucleótido F. La selección de los mejores oligonucleótidos posibles se refinó mediante el software libre Oligo analyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies). A continuación, se muestran los oligonucleótidos F y R resaltando el nucleótido que se ha modificado (en negrita) en el codón (subrayado) que codifica el aminoácido mutado:

- Topillo rojo 109M F: 5'-CCAAAAACCAAC**AT**G**A**AGCATGTGGCAG-3'
- Topillo rojo 109M R: 5'-CTGCCACATGCTT**CA**T**G**TTGGTTTTTGG-3'
- Topillo rojo 109L F: 5'-CCAAAAACCAAC**CT**G**A**AGCATGTGGCAG-3'
- Topillo rojo 109L R: 5'-CTGCCACATGCTT**CA**G**G**TTGGTTTTTGG-3'
- Topillo rojo 109A F: 5'-CCAAAAACCAAC**GCG**AAGCATGTGGCAG-3'
- Topillo rojo 109A R: 5'-CTGCCACATGCTT**CGC**GTTGGTTTTTGG-3'
- Topillo rojo 109V F: 5'-CCAAAAACCAAC**GT**G**A**AGCATGTGGCAG-3'
- Topillo rojo 109V R: 5'-CTGCCACATGCTT**CA**C**G**TTGGTTTTTGG-3'
- Topillo rojo 109F F: 5'-CCAAAAACCAAC**T**T**CA**AGCATGTGGCAG-3'
- Topillo rojo 109F R: 5'-CTGCCACATGCTT**GA**A**G**TTGGTTTTTGG-3'
- Topillo rojo 112M F: 5'-AACCTGAAGCAT**AT**G**G**CAGGCGCTGCC-3'
- Topillo rojo 112M R: 5'-GGCAGCGCCTGCC**AT**A**T**GCTTCAGGTT-3'

Partiendo de los plásmidos pOPINE que expresan la PrP de topillo rojo 109I, se efectuaron mutagénesis dirigidas secuenciales de dos pasos. Para ello, además de los oligonucleótidos específicos diseñados para introducir la mutación, se diseñaron dos oligonucleótidos que hibridan con una secuencia del vector pOPINE próxima al gen que codifica la PrP, un oligonucleótido F cerca del extremo 3' y un oligonucleótido R cerca del extremo 5' del ORF de la PrP del topillo rojo:

- Oligonucleótido F extremo 3': 5'-CTGGCGTGTGACCGGCGGC-3'

- Oligonucleótido R extremo 5': 5'-CCCTCCCATATGTCCTTCC-3'

La obtención de las secuencias con las diversas mutaciones se realizó en un proceso en dos pasos: una primera PCR con el oligonucleótido F que contuviera la mutación deseada y el oligonucleótido R del extremo 5'; y una segunda PCR con el oligonucleótido F del extremo 3' y el oligonucleótido R con la mutación. Las PCR se realizaron con 2 ng de plásmido pOPINE PrP₂₃₋₂₃₁ 109I de topillo rojo, 50 ng de cada oligonucleótido, 1,25 unidades de la enzima *Pfu DNA Polymerase* (Fermentas), 5 µl del tampón 10X para la enzima PFU (20 mM MgSO₄), 0,4 µl de dNTP 10 mM y H₂O (hasta 50 µl). La PCR se realizó con un ciclo inicial de desnaturalización del ADN a 95 °C durante 5 min, seguido de 40 ciclos de amplificación y una fase final adicional a 72 °C durante 10 min para permitir la extensión de los productos de PCR incompletos. Los productos obtenidos fueron almacenados y conservados a 4 °C.

Como resultado de estas dos reacciones se obtuvieron dos fragmentos de ADN que contenían un fragmento del gen de la PrP con la mutación deseada. Estos fragmentos se purificaron con el kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante. Una vez obtenidos, se procedió a la reconstrucción de la secuencia mutada completa, para lo que se realizó una tercera PCR empleando como molde estos fragmentos y los oligonucleótidos F del extremo 3' y R del extremo 5', que flanquean la secuencia completa y que nos permitirían obtener la PrP con la mutación deseada. Para la reacción se utilizaron 50-100 ng de fragmentos de ADN purificados de la primera fase, 50 ng de los oligonucleótidos F y R, 1.25 unidades de la enzima *Pfu DNA Polymerase* (Fermentas), 5 µl del buffer 10X para la enzima PFU (20mM MgSO₄), 0,4 µl de dNTP 10 mM y 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.

Con el fin de clonar las secuencias de ADN codificantes generadas en el vector de expresión pOPINE, se digirieron con la enzima de restricción XbaI (Fermentas), que reconoce una secuencia del extremo 5' del gen, y con la enzima BspHI, que digiere en una zona del extremo 3'. Las enzimas de restricción empleadas fueron seleccionadas con la ayuda del software libre NEBcutter V2.0 (New England Biolabs). Los fragmentos obtenidos se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v), teñidos con RedSafe 0.1% (v/v) (Proquinorte) y purificados con *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen), siguiendo el protocolo del fabricante.

Los fragmentos obtenidos fueron clonados en vectores pOPINE. Para ello, el plásmido y el inserto se mezclaron a un ratio molar 3:1 (inserto:vector), se añadió la enzima T4 DNA ligasa y su buffer de reacción correspondientes (Fermentas), y se incubaron las reacciones a 16 °C siguiendo el protocolo del fabricante. Una vez realizada la ligación, se procedió a la transformación de bacterias competentes *E. coli DH5 XL-Gold*[®] (Stratagene) mediante el protocolo estándar de choque térmico (352). Tras el cultivo en placa con medio LB agar (Pronadisa) suplementado con ampicilina (Sigma-Aldrich) a 50 µg/ml de concentración, se seleccionaron 3-4 de las colonias obtenidas que se crecieron en 2 ml de medio líquido LB-ampicilina. Partiendo de estos cultivos, se procedió a la purificación de

MATERIALES Y MÉTODOS

los plásmidos con el kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Para verificar que los plásmidos incorporaban las mutaciones deseadas y las secuencias correctas, fueron secuenciados mediante el servicio de secuenciación de Stabvida, empleando el oligonucleótido universal T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3').

2. Obtención de proteínas recombinantes

2.1 Transformación de bacterias *E. coli Rosetta (DE3)*TM

Para la producción de las diferentes proteínas recombinantes, utilizando los plásmidos descritos se transformaron bacterias *E. coli Rosetta (DE3)*TM (EMD Millipore), desarrolladas especialmente para la expresión de proteínas eucariotas. Para ello se utilizó el protocolo estándar de transformación por choque térmico. Los transformantes obtenidos fueron analizados según el protocolo previamente descrito para las bacterias *E. coli DH5 XL-Gold*[®] (Stratagene) y conservadas a -80 °C en medio LB con glicerol (Sigma-Aldrich) en proporción 1:1 (v:v).

2.2 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes

Las bacterias DE3 transformadas se cultivaron en 50 ml de medio LB en presencia de ampicilina a 37 °C en agitación a 200 rpm durante toda la noche. Tras el crecimiento de este precultivo, se escaló a 1 l de medio LB con ampicilina que se incubaba a 37 °C en agitación a 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0,8-1,0 (medida a 600 nm de longitud de onda). Una vez alcanzada, se procedió a inducir la síntesis de las proteínas mediante la adición de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Gold Biotechnology) a una concentración final de 1 mM. Tras la inducción, se mantuvieron en las mismas condiciones de incubación durante 3 h, tras las cuales se detuvo la inducción mediante la incubación de los cultivos en hielo durante 15 min. Finalmente, los cultivos se centrifugaron 15 min a 4500 *g* y 4 °C (Centrífuga Sorvall Legend XTR, Thermo Scientific), reservando el pellet de bacterias obtenido, ya que la proteína recombinante se expresa en forma de cuerpos de inclusión.

El lisado de este pellet bacteriano se realizó mediante la adición de 100 ml de solución de lisis 50 mM tris(hidroximetil)aminometano hidrocloreuro (Tris-HCl) (Fisher Bioreagents), 5 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Sigma-Aldrich), 1 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich), 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma-Aldrich), 100 μ g/ml Lisozima (Sigma-Aldrich), ajustado a pH 8.0 y la incubación durante 30 min a temperatura ambiente en presencia de 100 U/ml de desoxirribonucleasa (DNAsa) (Sigma-Aldrich) con agitación suave y cloruro de magnesio (MgCl₂) (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 20 mM, necesario para el correcto funcionamiento de la DNAsa. El producto de la lisis se centrifugó durante 1h a 8500 *g* y 4 °C. El precipitado obtenido se

resuspendió en 100 ml de solución 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), ajustado a pH 8.0 y fue centrifugado de nuevo en las mismas condiciones. Tras descartar el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en 12 ml de solución de inclusión 20 mM Tris-HCl (Fisher Bioreagents), 0.5 M NaCl (Sigma-Aldrich), 6 M hidrocloreuro de guanidinio (Gdn-HCl) (Fisher Scientific), ajustado a pH 8.0 y se incubó durante toda la noche a 37 °C con agitación suave para asegurar la correcta disolución de los cuerpos de inclusión. Finalmente, las muestras fueron de nuevo centrifugadas a 8500 *g* durante 1 h a 4 °C, conservando en esta ocasión el sobrenadante que se filtró con un filtro de jeringa con tamaño de poro de 0,22 µm (Minisart, Sartorius Stedim) previo a su paso por columna.

Para la purificación de la PrP a partir de este extracto de proteínas se utilizaron columnas de afinidad a histidinas *HisTrap FF Crude 5 ml* (GE Healthcare Amersham) acopladas a un sistema de FPLC (del inglés, Fast Protein Liquid Chromatography) (ÄKTA™ start, GE Healthcare Amersham). Previo al paso de la muestra, se procedió a equilibrar la columna con 7 VC (volúmenes de columna) de solución de unión 20 mM Tris-HCl (Fisher Bioreagents), 500 mM NaCl (Sigma-Aldrich), 5 mM Imidazol (Sigma-Aldrich), 2 M Gdn-HCl (Fisher Scientific), ajustado a pH 8.0. Tras la preparación de la columna, el extracto se cargó en la columna y se procedió a lavar las proteínas que no quedan retenidas en la columna con 15 VC de solución de unión. Finalmente, se eluyó la proteína con 6 VC de solución de elución 20 mM Tris-HCl (Fisher Bioreagents), 500 mM NaCl (Sigma-Aldrich), 500 mM Imidazol (Sigma-Aldrich), 2 M Gdn-HCl (Fisher Scientific), ajustado a pH 8.0. De cada uno de estos pasos (lisis, carga, lavado de la columna y elución) se tomaron 1 µl del lisado y 10 µl del resto de fracciones para comprobar el correcto funcionamiento del proceso de purificación. Estas fracciones fueron precipitados con 56,7 µl de metanol frío (Fisher Chemical) y centrifugadas 30 min a 19 000 *g* y 4 °C. El precipitado obtenido se resuspendió en 16 µl de solución de carga NuPAGE (Invitrogen Life Technologies) diluido 1:3 en PBS (del inglés Phosphate Buffer Saline) (Fisher Bioreagents) y se procedió a realizar una 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 esta forma, mediante tinción de proteína total con BlueSafe (Nzytech), se evaluaron no solo el correcto proceso de purificación sino también la pureza de las proteínas recombinantes obtenidas.

Para la conservación y mantenimiento de las proteínas purificadas, se aumentó la concentración de Gdn-HCl hasta 6M para asegurar una completa desnaturalización y se concentraron hasta alcanzar 1000 µM o 25 mg/ml mediante filtros de centrifugación con un límite de exclusión de 10 kDa *Amicon Ultra-15 10KDa Centrifugal filter unit* (Millipore). Finalmente, las proteínas recombinantes generadas se almacenan a –80 °C hasta su uso.

3. Propagación y generación de proteínas malplegadas *in vitro* mediante PMSA

3.1 Preparación de sustratos para PMSA

Para la propagación de priones *in vitro* se decidió utilizar la técnica PMSA que permite utilizar sustratos basados en PrP recombinante, sales, detergente y cofactores únicos para el malplegamiento espontáneo y la consecuente propagación. Para la preparación de los diferentes sustratos se utilizaron las proteínas recombinantes previamente purificadas. Para eliminar el Gdn-HCl en el que estaban conservadas y permitir la correcta renaturalización, se realizó una primera dilución 1:5 en PBS (Fisher BioReagents) y se cargaron en casetes de diálisis con un límite de exclusión de 10 kDa *Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette 10K MWCO* (Thermo Scientific). La diálisis se realizó a temperatura ambiente, con agitación suave y durante 1 h frente a PBS. Durante la diálisis, parte de la proteína no se pliega correctamente, sino que agrega formando acúmulos blanquecinos que fueron eliminados centrifugando la muestra a 19 000 *g* y 4 °C durante 15 min (Centrífuga Sorvall ST 16R, Thermo Scientific), conservando el sobrenadante. La concentración de proteína se midió utilizando el kit *BCA Protein Assay* (Fisher Scientific) siguiendo el protocolo del fabricante.

Finalmente, la proteína se diluyó en solución de conversión PBS (Fisher BioReagents), 150 mM NaCl (Sigma-Aldrich), 1 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich) en ratio 1:10, resultando en una concentración final de 2–3 μM o 50–70 $\mu\text{g/ml}$.

Partiendo de este sustrato base formado únicamente por proteína recombinante y solución de conversión, se prepararon los diferentes sustratos que se emplearon para la generación y propagación de priones recombinantes *in vitro*, así como los sustratos utilizados para la caracterización y para tratar de modificar los diferentes conformeros obtenidos.

-Sustrato sin cofactores: este sustrato no requiere de ningún aditivo. Se utiliza directamente la proteína diluida en solución de conversión.

-Sustrato de dextrano sulfatado: utilizando el sustrato base se añadió dextrano sulfatado 6500 – 10 000 kDa (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 0,5% (p/v). En el caso de algunas de las pruebas realizadas para la caracterización se requirió utilizar ambientes más restrictivos para la propagación, reduciéndose la concentración del cofactor a 0,05%.

-Sustrato con agentes caotrópicos: Al sustrato que contenía dextrano sulfatado al 0,5%, se le añadió urea (Amresco) o SDS (Sigma-Aldrich) en diferente proporción para alterar el estado de plegamiento de las proteínas. La urea fue añadida en los sustratos correspondientes a diferentes concentraciones (1 – 5 M) a partir de una solución inicial de urea 8 M disuelta en solución de conversión, para evitar

la dilución de sales en el sustrato final. El SDS se añadió a diferentes concentraciones (0.01 – 0.10 %) a partir de una solución inicial de 5 %.

Todos los sustratos se utilizaron recién preparados (mantenidos mientras tanto a 4 °C) o se congelaron a –80 °C para su correcta conservación hasta su uso.

3.2 Generación espontánea de proteínas malplegadas en PMSA

Para la generación espontánea de productos malplegados resistentes a la digestión con proteasas se utilizó la PMSA. En estos casos el sustrato de dextrano sulfatado al 0,5 % (DxS) con PrP de topillo rojo con el polimorfismo natural 109I se alicuotó en 500 – 800 µl en tubos de 2 ml con fondo cónico y tapón de rosca (Thermo Scientific) que contenían aproximadamente unos 200 mg de partículas esféricas de vidrio de 0,1 – 0,2 mm de diámetro. Una vez preparados, los tubos se introdujeron en termomixers con control de temperatura (*Digital Shaking Drybath*, Thermo Scientific). El proceso se realizó durante 24 h a 39 °C y 700 rpm de agitación continua. El resultado obtenido de los experimentos fue analizado mediante SDS-PAGE y tinción total de proteínas tras la digestión con PK (detallado más adelante) y conservado a –80 °C para su posterior amplificación y propagación.

3.3 Propagación de proteínas malplegadas en PMSA

Para la propagación de semillas *in vitro* se utilizó la PMSA de manera similar a como se empleó para la generación espontánea de material malplegado recombinante. El sustrato correspondiente fue alicuotado en 500 – 800 µl en tubos de 2 ml con fondo cónico y tapón de rosca (Thermo Scientific) que contenían partículas esféricas de zirconio-sílice de 1 mm de diámetro (BioSpec Products). Una vez alicuotados y preparados con las partículas esféricas, los tubos fueron inoculados con la semilla indicada en cada caso en una dilución variable entre 1:10 y 1:10⁸ (inóculo:sustrato), especificada en cada apartado.

Una vez inoculados, los tubos se sometieron a rondas de PMSA de hasta 24 h en termomixers con control de temperatura (*Digital Shaking Drybath*, Thermo Scientific). La temperatura empleada varió entre los 25 y los 39 °C dependiendo de si se quería realizar el proceso en condiciones óptimas (39 °C) o en condiciones restrictivas (temperaturas inferiores a 39 °C). Durante el proceso, las muestras estaban a una agitación constante de 700 – 900 rpm, indicada en cada caso.

De manera alternativa, se inocularon los tubos con semillas adsorbidas a la superficie de partículas esféricas de zirconio-sílice de 1 mm de diámetro, siendo la cantidad de rec-PrP^{res} adherida a su superficie suficiente para propagar en una única ronda de PMSA.

En el caso de requerir controles negativos sin inocular para comprobar que el resultado obtenido no era fruto de una contaminación o de un malplegamiento espontáneo, se utilizaron partículas esféricas de zirconio-sílice sin rec-PrP^{res} adherida a su superficie o bien, no se añadió ninguna semilla en

MATERIALES Y MÉTODOS

formato líquido. Los controles negativos fueron sometidos al mismo proceso de PMSA en paralelo con los tubos inoculados.

3.4 Adsorción de PrP malplegada a partículas esféricas para su posterior propagación en PMSA

Para permitir la adsorción de PrP recombinante malplegada a las partículas esféricas de zirconio-sílice es necesario tratar previamente las partículas para eliminar posibles restos que puedan contener y que dificulten el proceso. Para ello se lavaron tres veces con PBS (Fisher Reagents) y se realizó un aclarado final con H₂O estéril libre de nucleasas (Amresco, VWR International Eurolab), aplicando en cada lavado agitación mediante vórtex durante al menos 1h.

Para la adsorción de PrP malplegada a las esferas fue necesario utilizarlas en una ronda de PMSA como la descrita en el apartado 3.3 del presente capítulo, utilizando una semilla y un sustrato en proporción 1:100 (semilla:sustrato) sometidas a PMSA de 24 h a 39 °C y 700 rpm. Tras comprobar que el proceso había funcionado correctamente mediante la detección de PrP malplegada en el sobrenadante mediante digestión con proteasas y tinción de proteína total (detallado más adelante), las esferas se sometieron de nuevo a tres lavados con PBS y un lavado final con H₂O estéril libre de nucleasas para retirar restos de material arrastrado por las esferas al retirarlas de la solución pero que no haya quedado adherido a la superficie de las mismas, asegurándose así que el posterior malplegamiento observado al usarlas como semilla fue resultado única y exclusivamente de la rec-PrP^{res} adsorbida. Tras los lavados, las esferas se secaron a 42 °C en estufa para su conservación a temperatura ambiente (353).

Para determinar la capacidad de las partículas esféricas recubiertas de PrP malplegada para actuar como semilla, así como la homogeneidad en su carga se llevaron a cabo experimentos de control de calidad. Para ello, se utilizó una sola esfera cargada como semilla en un tubo de 2 ml con fondo cónico y tapón de rosca (Thermo Scientific) y 500 µl de sustrato con PrP recombinante con la misma secuencia que la de la semilla. Se realizaron 4 réplicas y se sometieron a PMSA de 24 h a 39 °C y 700 rpm. Tras la PMSA el resultado obtenido se visualizó mediante digestión con proteasas y tinción de proteína total y si era homogéneo e igual a la semilla de partida, las partículas esféricas de zirconio-sílice cargadas se conservaron para posteriores experimentos.

3.4 Modificación de proteínas malplegadas en PMSA alterando la composición del sustrato base

La modificación de las semillas obtenidas se decidió abordar mediante dos vías diferentes: eliminando el cofactor (dextrano sulfatado) del sustrato y añadiendo agentes caotrópicos o desnaturalizantes (urea y SDS) que alteren el estado de plegamiento de la proteína durante la PMSA.

En cada uno de los casos se utilizaron partículas esféricas de zirconio-sílice de 1 mm de diámetro previamente cargadas con las semillas en estudio. Se depositó una sola esfera cargada como semilla en un tubo de 2 ml con fondo cónico y tapón de rosca y se añadieron 500 µl de sustrato. Siendo este el sustrato sin cofactores o el complementado con las diferentes concentraciones de urea y SDS, tal y como se detalla anteriormente.

Los diferentes tubos se sometieron a una ronda de PMSA de 24 h a 39 °C y 700 rpm. Tras esta ronda inicial se realizaron un mínimo de dos rondas de PMSA en las mismas condiciones y en los correspondientes sustratos con diluciones 1:100 (semilla:sustrato) para asegurar la estabilización y/o adaptación de la semilla a este entorno, así como eliminar cualquier rastro de la semilla original. El resultado de las diferentes rondas fue analizado mediante digestión con proteasas y tinción de proteína total en SDS-PAGE.

Finalmente, para poder caracterizar los posibles cambios sufridos por las semillas sin el error artefactual que podría causar la ausencia de cofactores o la presencia de agentes desnaturalizantes en el sustrato, se emplearon las partículas esféricas de zirconia-sílice de la última ronda como semilla para inocular sustrato de dextrano sulfatado al 0.5 %. Tras la recuperación en dextrano sulfatado, de nuevo se realizaron al menos dos rondas con diluciones 1:100 (semilla:sustrato) para la estabilización de las semillas en el sustrato de origen. El resultado de esta estabilización fue utilizado para la caracterización bioquímica de cada semilla sometida a modificaciones en el sustrato de propagación.

4. Detección de PrP malplegada

4.1 Digestión de PrP malplegada con proteinasa K

Para la digestión de muestras de PMSA (ya sea tras un proceso que buscara la generación espontánea o tras la propagación de semillas, en formato líquido o adsorbidas a partículas esféricas), se tomaron 400 – 500 µl de cada muestra y se le añadió Proteinasa K (PK) (Roche) a una concentración final de 25 µg/ml. Una vez añadida la proteasa, la muestra se incubó a 42 °C durante 1 h en estufa (Nahita). Tras la incubación, se procedió a la centrifugación de las muestras a 19 000 *g* durante 15 min a 4 °C (Centrífuga Sorvall Legend XTR, Thermo Scientific). Tras esta primera centrifugación, se descartó el sobrenadante y el material sedimentado se lavó con 700 µl de PBS hasta deshacer el pellet. Posteriormente volvió a centrifugarse en las mismas condiciones, retirando el sobrenadante posterior. El pellet final se resuspendió en 15 µl de solución de carga NuPAGE (Invitrogen Life Technologies) diluida previamente 1:3 en PBS.

MATERIALES Y MÉTODOS

4.2 Detección de proteínas mediante electroforesis desnaturizante y tinción de proteína total

La evaluación de la presencia o ausencia de rec-PrP^{res} en las muestras tras la digestión con PK se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y posterior tinción de proteína total con la solución de tinción BlueSafe (Nzytech). Para ello, las muestras digeridas y resuspendidas en la solución de carga se hirvieron durante 10 min a 100 °C y se cargaron en geles de poliacrilamida con un gradiente de 4 – 12 % utilizando el sistema NuPage® Novex® (NuPAGE Midi gel, Invitrogen Life Technologies). El gel se sometió a 70 V durante 10 min, 110 V durante 10 min y una fase final de 150 V durante 1 h. Tras la electroforesis se realizó la tinción total de proteínas incubando el gel a temperatura ambiente y agitación suave en solución de tinción de proteína total BlueSafe durante 1 – 2 h.

5. Caracterización biológica de las PrP malplegadas obtenidas *in vitro*

Una vez seleccionados posibles diferentes conformeros de PrP recombinantes malplegadas *in vitro*, se procedió a la inoculación de las mismas para determinar si nos encontrábamos ante diferentes cepas priónicas. La caracterización biológica se realizó con ayuda del animalario de la Universidad de Santiago de Compostela y el profesor Jesús Rodríguez Requena, el animalario del Instituto Vasco de Investigaciones Agrarias (NEIKER) y la doctora Mariví Geijo, así como la colaboración para el estudio histopatológico con el Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA) y el doctor Enric Vidal.

5.1 Inoculación del modelo murino TgVole

Para el estudio *in vivo* se emplearon ratones transgénicos que expresaban la PrP de topillo rojo con el polimorfismo 109I (TgVole). Este modelo TgVole fue desarrollado por el grupo de investigación del doctor Joaquín Castilla en colaboración con el doctor Glenn Telling (Universidad de Colorado). Para la generación del modelo, la PrP de topillo rojo (BvPrP) se sintetizó de acuerdo a la secuencia presente en el GeneBank (AF367624.1 y EF455012.1) sobre el que se realizó la mutación en el residuo 109 cambiando el codón ATG a ATT para asegurar la expresión de la isoleucina. El vector para transgénesis pJB, que contenía la secuencia de la PrP de ratón clonado previamente mediante la diana XhoI (MoPrP.Xho) fue modificado reemplazando el XhoI por BsiWI y FseI. La secuencia codificante BvPrP 109I fue clonada en el vector de transgénesis en los sitios de restricción BsiWI y FseI, confirmándose su secuencia mediante la secuenciación del DNA. El *cassette* de expresión transgénica fue liberado con NotI y microinyectado en un pronúcleo de ovocitos FVB/N fertilizados

con lo que se estableció una línea transgénica nombrada Tg(BvPrP-I109)C594^{+/-}. Los niveles de expresión de BvPrP^C en los cerebros de estos ratones transgénicos se determinaron mediante *Western blot* y se compararon con ratones FVB *wild-type*. Los ratones Tg(BvPrP-I109)C594^{+/-} (TgVole) expresaban los mismos niveles de PrP^C que los ratones FVB *wild-type*, por lo que se nombraron como TgVole (1X).

Este modelo presenta un fenotipo muy similar al propio topillo rojo, como los cortos periodos de incubación cuando son infectados con determinadas cepas priónicas (354), además de poseer unos niveles de expresión de PrP^C indistinguibles del topillo rojo (348).

Para la inoculación intracerebral de las muestras, los animales se anestesiaron con ketamina (75 mg/kg) (IMALGENE 100mg/ml solución inyectable, Merial) mezclada con medetomidina (1 mg/kg) (DOMTOR 1 mg/ml solución inyectable, Ecuphar) y como reversor se empleó el atipamezol (1 mg/kg) (Reverse 5 mg/ml solución inyectable, Fatro) intraperitoneal. Una vez anestesiados, se inocularon con priones intracerebralmente utilizando una aguja hipodérmica de calibre 27 G con 15 - 20 µl del inóculo de interés homogenizado al 10 % (p/v) y diluido 1:10 en PBS (inóculo al 1 % final).

La evolución de la fase clínica, tanto para los animales inoculados como para aquellos que desarrollaban la enfermedad espontáneamente, se evaluó mediante la observación de signos clínicos en los animales de forma continua (monitorización diaria). Para considerar que un ratón tenía una sintomatología asociada a una enfermedad espongiforme transmisible (EET) y por consiguiente proceder a eutanasiarlo, fue necesario detectar un mínimo de tres signos clínicos de disfunción neurológica de manera simultánea. Los signos clínicos evaluados fueron:

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

Cuando la progresión de la enfermedad era evidente (con al menos 3 de los signos mencionados detectados simultáneamente) se procedió a la eutanasia de los animales por razones éticas mediante dislocación cervical o inhalación de CO₂ para la toma de muestras biológicas. De los animales se extrajo el encéfalo completo, realizando un corte longitudinal separando los dos hemisferios; uno de

MATERIALES Y MÉTODOS

ellos se congeló y almacenó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su análisis bioquímico mediante *Western blot*, mientras que la otra mitad se fijó en paraformaldehído al 4 % (Sigma-Aldrich) para su estudio histopatológico.

5.2 Estudio histopatológico

Los hemisferios de los cerebros procedentes de los ensayos de infectividad *in vivo* fijados en paraformaldehído al 4 % se deshidrataron mediante concentraciones crecientes de alcohol, a través de xileno y finalmente se incluyeron en parafina. Secciones de $4\text{ }\mu\text{m}$ 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. En este estudio se analizaron catorce secciones encefálicas: corteza piriforme, hipocampo, corteza occipital, corteza temporal, corteza parietal, corteza frontal, estriado, tálamo, hipotálamo, mesencéfalo, médula oblonga, núcleos cerebelosos, vermis cerebeloso y corteza cerebelosa.

El análisis 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 peroxidasas endógenas se bloquearon y las muestras se pretrataron con PK y se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo primario 6C2 (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 EET 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 de IHQ 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, linear (axones), placas (extracelular), estrellado (células gliales) y perivascular.

5.3 Detección de PrP^{Sc} en encéfalo

Como parte del análisis de los animales infectados, se quiso visualizar la presencia de PrP^{Sc} encefálica como resultado de la inoculación con el material recombinante malplegado proveniente de PMSA.

Para la detección de PrP^{Sc}, se homogeneizaron los hemisferios de cerebros no fijados al 10 % en solución de conversión. Debido a que la visualización se realizó mediante *Western blot* y a que las muestras proceden de material biológico en lugar de PrP recombinante, el proceso de preparación de las muestras para su visualización difiere de la digestión y visualización de muestras de PMSA. Del

homogeneizado de encéfalo se tomaban 5 µl que se diluyeron 1:3 en PBS con 2 % de Tween-20 (Sigma-Aldrich), 2 % de Nonidet P40 (Sigma-Aldrich) y 5 % de Sarcosyl (Sigma-Aldrich). A la mezcla final se le añadió PK (Roche) a una concentración final de 85 µg/ml y se incubaron a 56 °C durante 1h en agitación constante de 450 rpm en Termomixer (Eppendorf). Tras la incubación se añadían 10 µl de NuPAGE 4x (Invitrogen Life Technologies) para detener la reacción.

Una vez digeridas, las muestras se hirvieron durante 10 min a 100 °C y se llevó a cabo una electroforesis desnaturizante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida utilizando el sistema Criterion TGX gel 4–15 % (Bio-Rad). Una vez realizada la electroforesis, se transfirieron las proteínas a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF, del inglés *PolyVinylidene DiFluoride*) (Trans-Blot Turbo Transfer Pack PVDF, Bio-Rad) utilizando el equipo Trans Blot Turbo System (Bio-Rad). Las membranas se sumergieron en solución de bloqueo PBS (Fisher Bioreagents), 5 % (p/v) leche deslipidada, 0,05 % (v/v) Tween-20 (Sigma-Aldrich) durante 1 h a temperatura ambiente y agitación suave para evitar las uniones inespecíficas, y posteriormente se incubaron en presencia del anticuerpo primario D18 (en dilución 1:5 000). Tras lavar la membrana con PBS y 0.05 % Tween-20, se procedió a incubar durante 1 h con el anticuerpo secundario policlonal anti-IgG de cabra conjugado con la peroxidasa de rábano. La membrana fue de nuevo lavada antes de ser revelada mediante quimioluminiscencia utilizando el kit Super Signal West Pico (Thermo Scientific Pierce). La toma de imágenes digitales se realizó con el equipo FluorChem Q (Alpha Innotech) y el software Alphaview (Alpha Innotech).

6. Caracterización bioquímica de las PrP malplegadas

Para la caracterización de las cepas recombinantes obtenidas *in vitro*, tanto originales como modificadas, se tuvieron en cuenta una serie de características bioquímicas, como el perfil de bandas presente tras la digestión con proteasas visualizadas en SDS-PAGE, la capacidad para propagar *in vitro* a expensas de PrP recombinantes con secuencias diferentes a la de origen (topillo rojo 109I) y la capacidad para formar fibras y su morfología cuando la muestra era analizada mediante microscopía electrónica.

6.1 Capacidad de propagación *in vitro* a expensas de PrP de topillo rojo con mutaciones puntuales y PrP de otras especies

Las semillas originales y sus variantes modificadas según los procesos previamente detallados se conservaron en formato sólido (adsorbidas a partículas esféricas de zirconio-sílice de 1 mm de diámetro) y se utilizaron para inocular tubos de PMSA con PrP recombinantes diferentes a la de origen. Las PrP empleadas se pueden agrupar en proteínas de topillo rojo con mutaciones puntuales

MATERIALES Y MÉTODOS

en las posiciones 109 (metionina, leucina, alanina, valina y fenilalanina) y 112 (metionina); y proteínas de otras especies (ratón *wild-type* y oveja M112I).

Para el análisis de la capacidad de propagación de las semillas en los diferentes polimorfismos se realizaron experimentos de PMSA en condiciones óptimas (dextrano sulfatado al 0,5% en el sustrato, y PMSA a 39 °C y 700 rpm) o restrictivas (dextrano sulfatado a 0,05%, y PMSA a 27-28 °C y 900 rpm) cuando las condiciones óptimas no permitían diferenciar entre semillas ya que todas propagaban en igualdad de condiciones. Los diferentes procedimientos se detallan en el apartado correspondiente.

Para la propagación, cada sustrato se alicuotó a 500 µl en tubos de 2 ml con fondo cónico y tapón de rosca (Thermo Scientific) que contenían una partícula esférica de zirconio-sílice de 1 mm de diámetro (BioSpec Products) cargada con la correspondiente semilla preparada como se ha explicado anteriormente. De cada experimento se realizó una réplica para asegurar el resultado positivo o negativo, así como controles negativos con esferas de zirconio-sílice no cargadas previamente con ninguna semilla. De esta forma se controlaron el malplegamiento espontáneo y la contaminación de los tubos.

Los resultados de la propagación fueron analizados mediante digestión con PK y tinción de proteína total en SDS-PAGE.

6.2 Detección de estructuras fibrilares mediante microscopía electrónica

Las diferentes semillas seleccionadas en las fases previas fueron caracterizadas mediante microscopía electrónica de transmisión usando el método de tinción negativa. Se tomaron 500 µl de material malplegado proveniente de PMSA y se dispuso en tubos eppendorf de 1,5 ml sobre 500 µl de un colchón de sacarosa al 30 %. Las muestras se centrifugaron a 19 000 *g* durante 30 min y se retiró el sobrenadante con cuidado de no afectar al pellet, que fue resuspendido en 500 µl de PBS. El pellet resuspendido se digirió con PK a una concentración final de 25 µg/ml en estufa de laboratorio sin agitación durante 30 min a 42 °C. Tras la digestión, se siguió el protocolo previamente explicado, centrifugando la muestra a 19 000 *g* durante 15 minutos. El pellet final se resuspendió en 10 µl de solución tampón 10 mM Tris-HCl (Fisher Bioreagents), 10 mM cloruro de sodio (NaCl) (Sigma-Aldrich).

Una vez preparadas, las muestras se depositaron sobre rejillas de cobre con una fina película de carbón que previamente se habían sometido a descarga iónica para hidrofilar la superficie de la película de carbón, lo que favorece la adsorción de la muestra. La rejilla fue colocada de forma que la película de carbón estuviera en contacto con la muestra y fue incubada en esta posición durante 1 min a temperatura ambiente. A continuación, la rejilla se depositó sobre agua mili-Q para lavar el exceso de muestra no adherida a la rejilla y se retiró el exceso de líquido mediante el contacto del

borde de la rejilla con papel de filtro. Finalmente, las rejillas se depositaron sobre gotas de acetato de uranilo al 2 % (p/v) y se incubaron durante 45 s para su tinción. El secado de las rejillas antes de su visualización al microscopio se realizó a temperatura ambiente sobre papel de filtro.

La adquisición de imágenes se realizó en un microscopio de transmisión JEM-1230 (JEOL) estabilizado a 100 kV equipado con una cámara CCD Orius SC1000 (GATAN). Las micrografías se obtuvieron a diferentes magnificaciones siempre tratando de mostrar las partes más representativas y de manera que permitiese caracterizar correctamente las muestras.

6.3 Análisis de similitud

Tras las diferentes pruebas bioquímicas, las semillas fueron comparadas entre ellas utilizando el coeficiente de coincidencia simple (SMC, del inglés *Simple Matching Coefficient*) o coeficiente de similitud de Rand (355) que mide el grado de similitud entre dos conjuntos. Es un índice de análisis cualitativo que permite analizar la similitud entre dos elementos (en este caso dos PrP malplegadas) en base al análisis de características presentes o ausentes en estos elementos. En el caso de las PrP malplegadas, estas características serían la capacidad para propagar en un PrP diferente a la homóloga de la semilla y la capacidad para formar o no fibras. Si presentan el rasgo se les otorga el valor 1 y si no lo presentan se les otorga el valor 0, generando una matriz booleana, es decir, exclusivamente compuestas por ceros y unos.

Para el cálculo del SMC, supongamos dos elementos A y B con n atributos con valores iguales a 0 o a 1. Partiendo de este supuesto, el SMC se define como:

$$SMC = \frac{\text{número de atributos con valor coincidente}}{\text{número total de atributos analizados}}$$

$$SMC = \frac{M_{00} + M_{11}}{M_{00} + M_{01} + M_{10} + M_{11}}$$

Donde:

		A	
		0	1
B	0	M_{00}	M_{10}
	1	M_{01}	M_{11}

- M_{00} es el número de atributos con valor 0 en los elementos A y B
- M_{01} es el número de atributos con valor 0 en el elemento A y valor 1 en elemento B
- M_{10} es el número de atributos con valor 1 en el elemento A y valor 0 en elemento B
- M_{11} es el número de atributos con valor 1 en los elementos A y B

RESULTADOS

1. Obtención de diferentes PrP recombinantes malplegadas de topillo rojo 109I

1.1 Generación espontánea PrP recombinantes malplegadas en PMSA

La amplia capacidad de la proteína priónica del topillo rojo para malplegar y dar lugar a confórmeros infecciosos ha hecho de este animal un modelo muy útil para el estudio de las enfermedades priónicas (356, 357, 358, 359, 360). La posibilidad de trabajar con proteínas de topillo rojo recombinantes en entornos controlados de laboratorio permite estudiar en profundidad los procesos moleculares que tienen lugar en el malplegamiento, así como de ver el efecto de pequeñas variaciones en el entorno bioquímico (como por ejemplo la adición u eliminación de cofactores) en el proceso de malplegamiento espontáneo de la PrP (245). Por ello, escogimos esta proteína para estudiar las diferentes cepas que se pueden obtener espontáneamente en PMSA con dextrano sulfatado como cofactor. Para estudiar la espontaneidad se realizaron diferentes PMSA con sustrato de PrP recombinante de topillo rojo con el polimorfismo 109I complementado con dextrano sulfatado y esferas de vidrio que han demostrado ser de utilidad para promover el malplegamiento espontáneo en PMSA (361). Este procedimiento se repitió en múltiples ocasiones buscando una diversidad de patrones electroforéticos tras la digestión de las muestras con PK, tratando de obtener la mayor variabilidad posible de confórmeros (Figura 8A). Para ello se realizaron varias rondas seriadas de PMSA independientes, de las cuales se seleccionaron cinco productos malplegados que presentaban patrones electroforéticos diferentes nombradas como “ust” (del inglés, *unseeded strain*) y seguido del número del experimento correspondiente. Los cinco confórmeros seleccionados (Figura 8B) presentan una banda resistente a la digestión por PK de 16 kDa, a excepción de ust05, que solo presenta una banda central de en torno a 9 kDa. Las muestras ust01 y ust02 presentan un patrón similar con una banda central de ~9 kDa, pero que venía acompañada por una banda ligeramente inferior de ~6kDa. Por el contrario, ust06 presenta también un doblete central, pero formado por una banda de ~9 kDa y otra superior de ~11 kDa. El quinto de los cinco confórmeros seleccionados, ust09, presenta una banda predominante de 16 kDa y un patrón difuso de bandas de menor tamaño.

Tras la obtención de las diferentes proteínas malplegadas espontáneamente, estas fueron propagadas en sustrato de topillo rojo 109I complementado con dextrano sulfatado y con partículas esféricas de zirconia-sílice de 1 mm que promueven la propagación pero no la generación espontánea de nuevos confórmeros. De esta forma, se consiguieron partículas de zirconia-sílice cargadas con los

RESULTADOS

de CWD adaptada a PMSA con dextrano sulfatado como cofactor (348). Para asegurar que las diversas rondas de PMSA no alteraban las propiedades de la semilla, así como control para las diferentes pruebas de la caracterización bioquímica, se tomaron como dos semillas distintas nombradas como sst00 y sst01 (del inglés, *seeded strain*) (Figura 9).

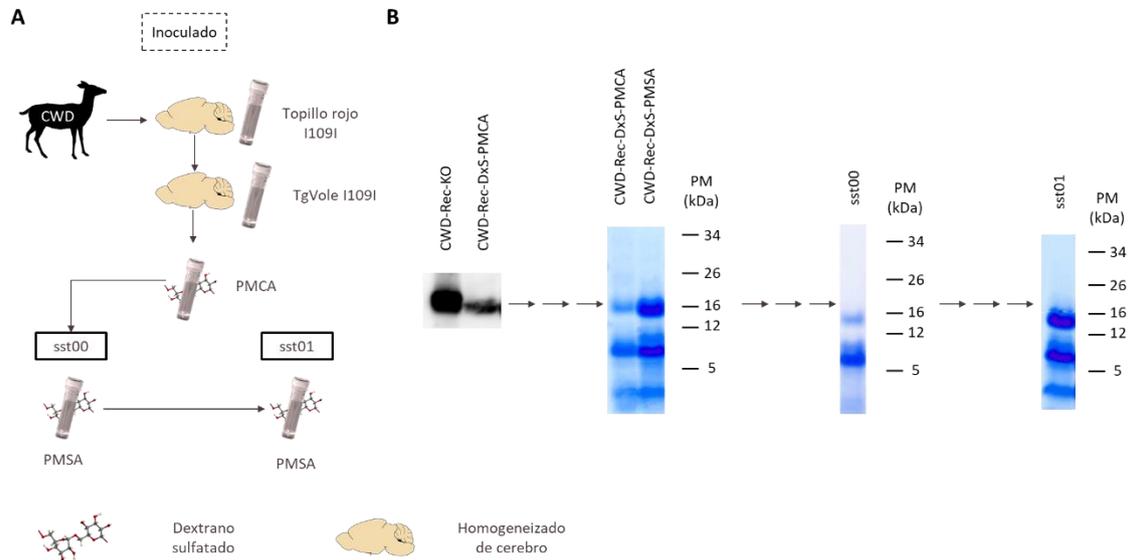


Figura 9. Generación de proteínas recombinantes malplegadas resistentes a proteasa mediante adaptación de priones de CWD a topillo rojo en PMSA. A) Esquema del origen de las diferentes semillas obtenidas a partir de la cepa CWD proveniente de cérvidos afectados y su adaptación a PMSA con dextrano sulfatado como cofactor. Se muestran los pasos previos, especificando la técnica (PMCA o PMSA) y el tipo de sustrato (homogeneizado de cerebro de topillo rojo, de TgVole o sustratos con un solo cofactor: dextrano sulfatado 0.5% p/v). B) Patrones de movilidad electroforética tras la digestión con proteinasa K (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 42 $^{\circ}\text{C}$, 1 h) de diferentes puntos de la adaptación. Los resultados fueron analizados mediante *Western blot* (CWD-Rec-KO y CWD-Rec-DxS-PMCA) revelados con el anticuerpo SAF83 o mediante SDS-PAGE y tinción de proteína total, dando lugar a las semillas sst00 y sst01. PM: Marcador de peso molecular.

Estas dos semillas presentan un patrón similar a la semilla ust06, obtenida de manera espontánea en PMSA, con una banda resistente a PK de ~ 16 kDa y otra de ~ 9 kDa (Figura 10). Si bien en ocasiones la banda de ~ 9 kDa puede llegar a ser muy tenue y resultar inapreciable mediante tinción de coomassie.

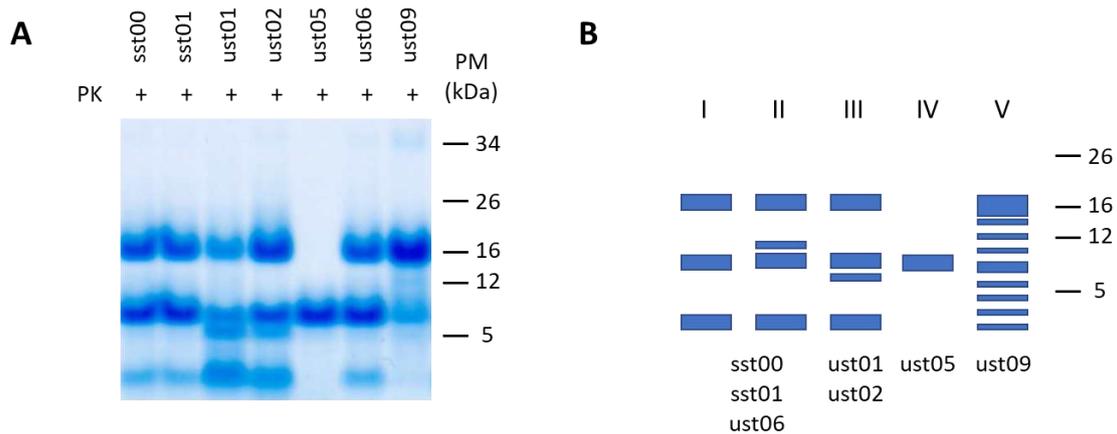


Figura 10. Patrones de movilidad electroforética de las semillas seleccionadas. A) Análisis comparativo de los patrones de movilidad electroforética mediante digestión con proteinasa K (25 µg/ml, 42 °C, 1 h), SDS-PAGE y tinción de proteína total de las semillas seleccionadas como potenciales confórmeros debido a sus patrones distintivos tras su estabilización en PMSA. B) Representación esquemática de los patrones de movilidad electroforética de las semillas seleccionadas, en las que se distinguen cinco patrones diferentes (I a V) en función de la presencia o ausencia de las bandas de ~16 kDa, ~11 kDa, ~6 kDa o de fragmentos en forma de un patrón difuso y entre las que pueden clasificarse las siete semillas seleccionadas. PK: Proteínasa K. PM: Marcador de peso molecular.

1.3 Análisis mediante microscopía electrónica de transmisión y tinción negativa

Una de las características más interesantes de algunas cepas priónicas es la capacidad de generar fibras que se pueden visualizar mediante microscopía electrónica. Algunas proteínas malplegadas recombinantes han presentado también esta propiedad, por lo que son de interés para la generación de modelos estructurales de la PrP^{Sc}. Por ello se plantea el análisis de estas semillas generadas para comprobar si forman fibras visibles a microscopía electrónica aptas para estudios de alta resolución.

Para su análisis, las diferentes semillas fueron sometidas a una centrifugación con un colchón de sacarosa para eliminar elementos menos densos y tratadas con PK antes de ser visualizadas al microscopio electrónico mediante tinción negativa.

Las diferentes semillas presentan estructuras fibrilares de tamaños diversos claramente observables en las micrografías (Figura 11). Las semillas sst00 y sst01 presentan estructuras similares, con fibras de hasta 1 µm fraccionadas y normalmente asociadas en grupos (Figura 11A y 11B). Por la contra, las semillas ust01 y ust02 presentan fibras de unos 500 nm agrupadas en fascículos de mayor tamaño, que en ocasiones se ven fraccionados o con fibras sueltas que surgen del haz mayor (Figura 11C y 11D). La semilla que presenta las estructuras o agrupaciones fibrilares de mayor tamaño es ust06, con haces de fibras de hasta varias micras (Figura 11F). La semilla ust09 presenta grandes agrupaciones de fibras pequeñas (~200 nm) que pueden verse de manera más aislada en los extremos de estas agrupaciones (Figura 11G). La gran excepción es la semilla ust05 que, si bien

RESULTADOS

presenta fibras, estas nunca se encuentran aisladas, sino que siempre emergen de cúmulos proteicos muy densos (Figura 11E).

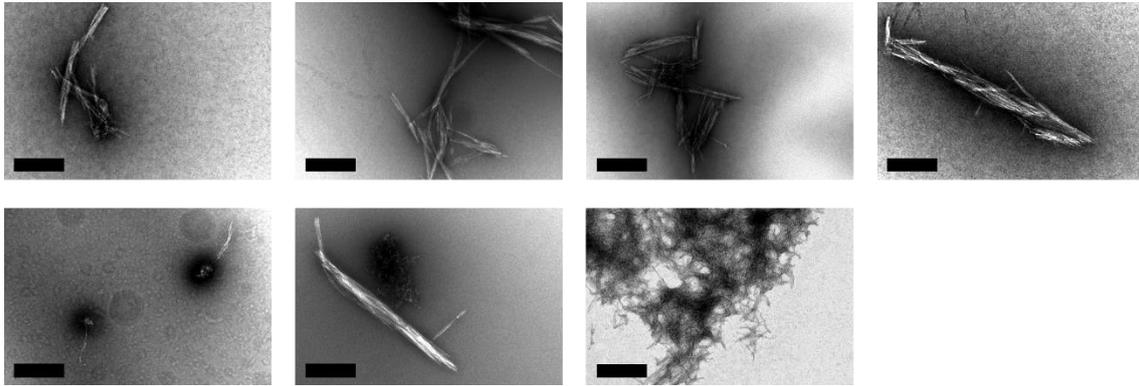


Figura 11. Micrografías de las fibras de PrP recombinante malplegada observadas en cada semilla mediante microscopía electrónica de transmisión. Todas las muestras fueron previamente centrifugadas con un colchón de sacarosa al 30 % y digeridas con proteinasa K (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 42 $^{\circ}\text{C}$, 30 min). Finalmente se prepararon mediante tinción negativa con acetato de uracilo. A) sst00, B) sst01, C) ust01, D) ust02, E) ust05, F) ust06, G) ust09. Todas las semillas presentan formaciones fibrilares a excepción de ust05 (E), que tiene agregados proteicos amorfos de los que surgen fibras cortas. Las barras negras inferiores tienen un tamaño de 500 nm.

2. Caracterización biológica preliminar de las cepas seleccionadas mediante la inoculación intracerebral en TgVole (1x)

Las semillas seleccionadas, ya sean de origen espontáneo o no, fueron inoculadas en ratones transgénicos TgVole (1x) para determinar su infectividad y caracterizar sus propiedades biológicas. Los animales fueron inoculados intracerebralmente y monitorizados para detectar la aparición de signos del desarrollo de una enfermedad priónica.

Todas las semillas inoculadas resultaron infecciosas con tasas de ataque del 100 %, que además de por la presencia de signos neurológicos se confirmaron mediante la detección de PrP^{Sc} en el encéfalo con un patrón clásico tribandeado (correspondiente a la PrP no glicosilada, mono y diglicosilada). Como excepción al resto, la semilla ust05 no dio lugar a signos neurológicos evidentes, y en un principio la muerte de los animales se asoció a enfermedades intercurrentes y no al desarrollo de una prionopatía derivada de la inoculación. No obstante, sí se detectó PrP^{Sc} clásica en al menos uno de los ratones inoculados, por lo que es posible que pudiera causar enfermedad en una segunda inoculación sucesiva.

El mayor tiempo de supervivencia (basado en el desarrollo de signos neurológicos inequívocos de enfermedad priónica) lo presentaron los animales inoculados con las semillas sst01 y ust06, con un tiempo de supervivencia medio de 250 ± 11 y 210 ± 7 dpi (días post inoculación), respectivamente;

mientras la enfermedad de evolución más rápida la causó la inoculación de la ust02, observándose un tiempo medio de supervivencia en el primer pase de 101 ± 4 dpi. Los animales inoculados con las semillas ust01 y ust09 presentaron tiempos de supervivencia intermedios con respecto al resto (153 ± 5 dpi y 169 ± 5 dpi, respectivamente) (Tabla 1, Figura 12A).

Tabla 1. Datos de la inoculación intracerebral de las diferentes semillas recombinantes de topillo rojo seleccionadas en el modelo TgVole (1x) y análisis de la presencia de PrP^{Sc} encefálica. Dpi: días post inoculación.

Inóculo	Pase 1			Pase 2		
	Tasa de ataque	PrP ^{Sc} detectada en cerebro	Media de supervivencia \pm error estándar (dpi)	Tasa de ataque	PrP ^{Sc} detectada en cerebro	Media de supervivencia \pm error estándar (dpi)
sst01	100% (10/10)	Clásico (10/10)	250 ± 11	100% (4/4)	Clásico (4/4)	115 ± 4
ust01	100% (13/13)	Clásico (13/13)	153 ± 5	100% (13/13)	Clásico (13/13)	94 ± 3
ust02	100% (9/9)	Clásico (9/9)	101 ± 4	100% (6/6)	Clásico (6/6)	80 ± 3
ust05	100% (5/5)	Clásico (1/5) Atípico (4/5)	284 ± 27	En proceso	En proceso	En proceso
ust06	100% (8/8)	Clásico (8/8)	210 ± 7	100% (7/7)	Clásico (7/7)	100 ± 1
ust09	100% (7/7)	Clásico (7/7)	169 ± 5	100% (5/5)	Clásico (5/5)	110 ± 2

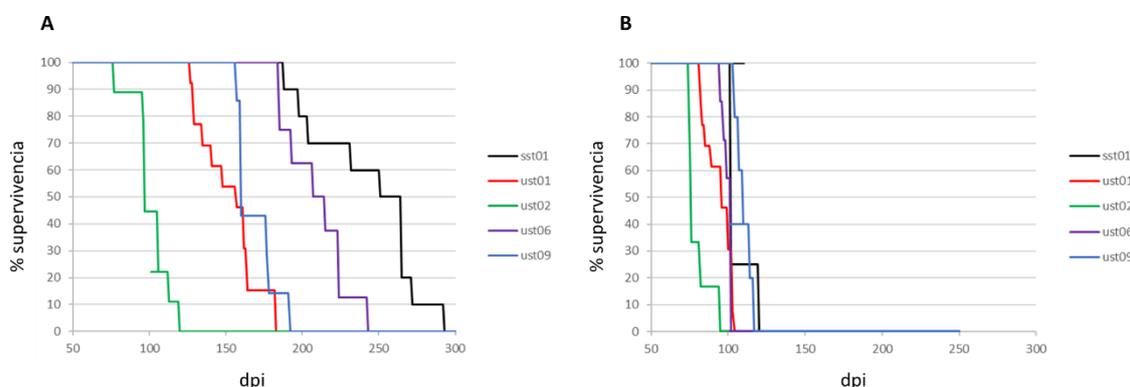


Figura 12. Supervivencia del modelo TgVole (1x) inoculado con las diferentes semillas seleccionadas de topillo rojo recombinante. Todos los animales fueron anestesiados e inoculados intracerebralmente con una dilución 10^{-2} de las diferentes semillas recombinantes (Pase 1, A) o de una dilución igual de un encéfalo de ratón positivo del primer pase (Pase 2, B). Después, los animales fueron seguidos y controlados hasta la aparición de los primeros signos neurológicos. Los animales se sacrificaron mediante disloque cervical y se les extrajo el encéfalo para su análisis. En los animales inoculados en el primer pase (A), se puede observar la siguiente supervivencia: sst01 250 ± 11 dpi, ust01 153 ± 5 dpi, ust02 101 ± 4 dpi, ust06 210 ± 7 dpi, ust09 169 ± 5 dpi. En los animales inoculados en el primer pase (A), se puede observar la siguiente supervivencia: sst01 115 ± 4 dpi, ust01 94 ± 3 dpi, ust02 80 ± 3 dpi, ust06 100 ± 1 dpi, ust09 110 ± 2 dpi.

Utilizando los cerebros de ratones inoculados en este experimento, se realizó un segundo pase para poder evaluar mejor las diferencias que presenta cada semilla tras su estabilización en el modelo animal. Todas las semillas presentaron una tasa de ataque completa y una reducción significativa en

RESULTADOS

el tiempo de supervivencia medio, según lo esperable tras la adaptación de semillas recombinantes al modelo animal. No obstante, las características observadas en el primer pase se mantienen, siendo ust02 la que da lugar al desarrollo de la enfermedad más rápido (80 ± 3 dpi), seguida por la ust01 (94 ± 3 dpi). Así mismo, las semillas ust06 y ust09 siguieron mostrando tiempos similares de supervivencia, ambas superiores a los 100 dpi (100 ± 1 y 110 ± 2 , respectivamente) (Tabla 1, Figura 12B).

El análisis histopatológico preliminar de los cerebros de los ratones en el primer pase revela en todos los casos signos de espongiosis evidenciado mediante vacuolas visibles en tinciones de hematoxilina y eosina; así como depósitos de PrP^{res} observables en tinciones de inmunohistoquímica. Estos depósitos son variables en cuanto a localización y tamaño: acúmulos leves distribuidos de manera difusa en el caso de ust01, ust06 y ust09, placas en tálamo y corteza prefrontal en ust02, y acúmulos intracitoplasmáticos observados en sst01 (Figura 13).

El análisis histopatológico completo, así como la caracterización del segundo pase de la semilla ust05, se encuentran aún en proceso de estudio en la fecha en la que se escribe esta tesis, con el objetivo de obtener un análisis comparativo detallado del patrón de lesiones. No obstante, los resultados preliminares obtenidos indican claramente la existencia de diferencias en las características biológicas entre las distintas semillas recombinantes generadas.

3. Generación de un panel de pruebas bioquímicas que permitan caracterizar *in vitro* las diferentes cepas priónicas

Debido a que la caracterización biológica reveló que las diferentes semillas generadas mediante PMSA se comportan como cepas distintas, buscamos una forma de caracterizarlas *in vitro*, bioquímicamente, con el objetivo de establecer una metodología que permitiera evaluar rápidamente las similitudes y diferencias entre los distintos productos de PMSA generados.

Para ello se decidió hacer uso del fenómeno de barrera de transmisión, que restringe la propagación de determinadas cepas a expensas de distintas PrP debido a diferencias en las secuencias aminoacídicas de la PrP malplegada de origen (semilla) y de la PrP nativa que conforma el sustrato o incompatibilidades estructurales entre ambas, ya sea *in vivo* o *in vitro*. En este caso, para la caracterización en laboratorio se hizo uso de la técnica PMSA y de sustratos que contenían PrP recombinantes con secuencias aminoacídicas diferentes a la semilla original.

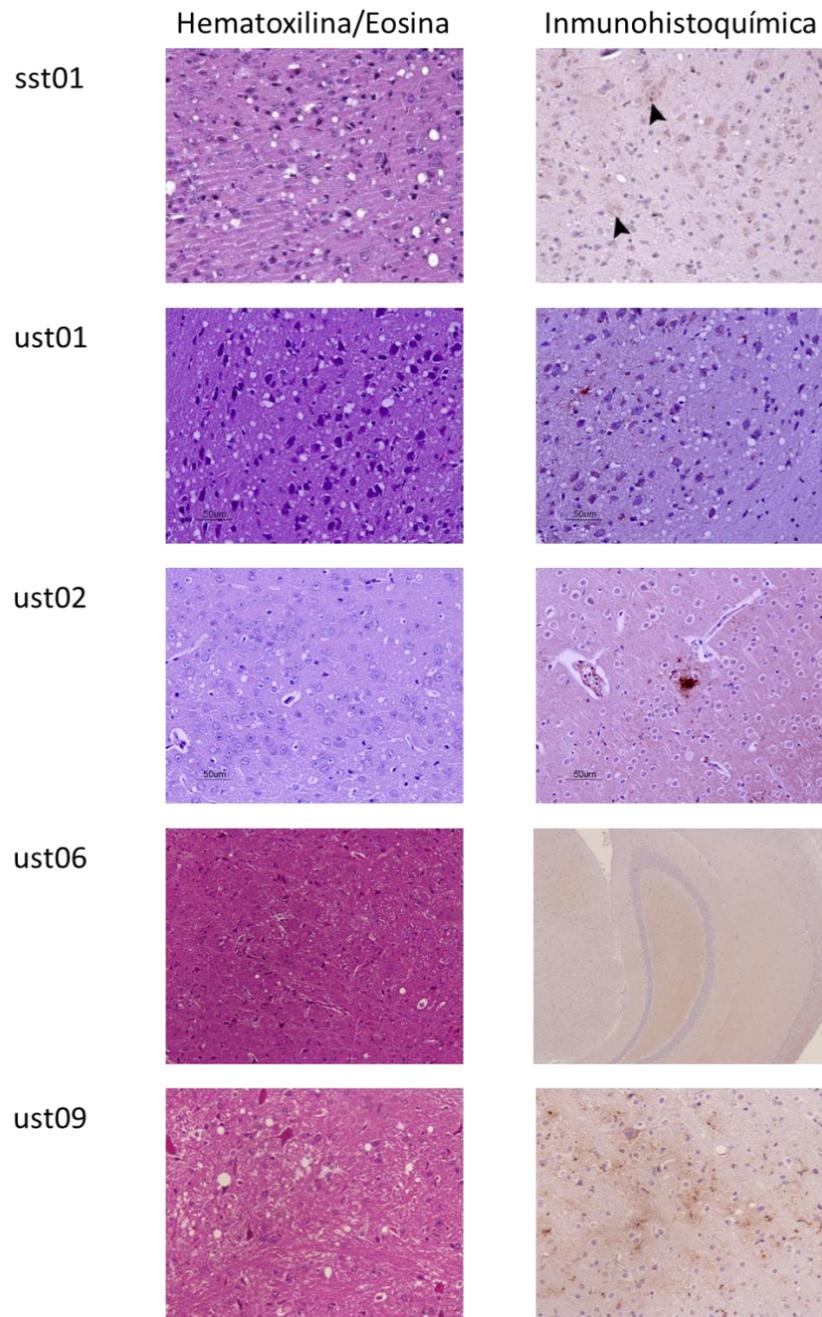


Figura 13. Estudio histopatológico de los encéfalos de TgVole (1x) inoculados con las semillas seleccionadas. Ante la detección de signos de alteración neurológica, los animales se sacrificaron mediante disloque cervical y se les extrajo sangre, encéfalo y bazo. La mitad del encéfalo se conservó en paraformaldehído al 4%, después se embebió en bloques de parafina y se realizaron los diferentes cortes para estudios histopatológicos. Los tejidos se tiñeron con hematoxilina-eosina y el análisis inmunohistoquímico se realizó con el anticuerpo 6C2 (1:1 000). En las imágenes teñidas con hematoxilina y eosina se pueden observar vacuolas (espongiosis leve/moderada), mientras que en las muestras de inmunohistoquímica se observa un inmunomarcaje punteado fino de PrP^{res} en un patrón difuso en el caso de ust09, ust06 y sst01, mientras que en ust01 se observan acúmulos y difusos y en ust02 se aprecian placas de PrP^{res} en tálamo y córtex prefrontal. La imagen de inmunohistoquímica de ust06 fue seleccionada a pesar de la diferencia de aumento con respecto al resto, por ser en la que mejor se aprecia la distribución difusa de PrP^{res} en los animales inoculados con dicha semilla.

RESULTADOS

3.1 Evaluación de la capacidad propagativa de las distintas cepas recombinantes a expensas de PrP recombinante de topillo rojo con mutaciones puntuales

Ya que la variación en un solo aminoácido en la secuencia es suficiente para evidenciar el fenómeno de barrera, se decidió elegir proteínas recombinantes con mutaciones puntuales en las posiciones 109 (metionina, leucina, alanina, valina y fenilalanina) y 112 (metionina) con el objetivo de detectar diferencias en la capacidad de propagación de las semillas que ya mostraron comportamientos distintivos *in vivo*. Las diferentes semillas en estado sólido se propagaron en una sola ronda de PMSA en sustratos que contenían las diferentes proteínas recombinantes.

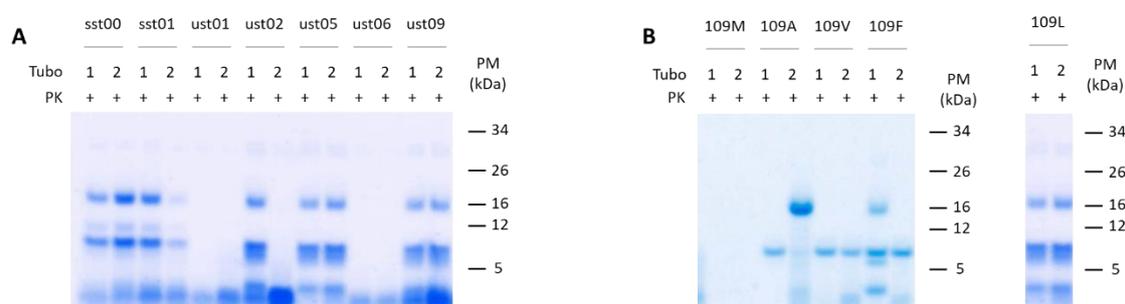


Figura 14. Ejemplos representativos de los experimentos realizados para el análisis bioquímico de las semillas seleccionadas. A) Ejemplo de caracterización de la capacidad de propagación en 24 h de PMSA de las distintas semillas en un sustrato con proteína recombinante de topillo rojo con la mutación 109L complementado con dextrano sulfatado. La capacidad de propagación de cada semilla se evaluó por duplicado (tubos 1 y 2) y los productos de PMSA fueron digeridos con proteinasa K (25 ug/ml, 42°C, 1h) y visualizados mediante electroforesis en SDS-PAGE y tinción de proteína total. Como se puede observar, las semillas ust06 y ust01 no generan productos resistentes a la digestión por proteasas (y por lo tanto se considera que no consiguen propagar a expensas de esta proteína), mientras que las demás semillas presentan al menos una réplica con material resistente a proteasas (considerándose como positivo). B) Estudio de la capacidad de propagación de la semilla ust05 en 24 h de PMSA en sustratos con las proteínas recombinantes de topillo rojo con las mutaciones 109M, 109A, 109V, 109F y 109L, procesadas de la misma forma que las anteriores y donde se ilustran los cambios de patrón de movilidad electroforética que se observan al propagar esta semilla en los sustratos con 109A, 109F y 109L, mientras que su propagación en el sustrato con la mutación 109V no produce alteraciones observables y no se detecta propagación en el sustrato 109M. PM: Marcador de peso molecular.

En el caso de las proteínas con mutaciones puntuales en la posición 109, todas las semillas propagaban sin dificultad en experimentos de PMSA en condiciones estándar (39 °C y 700 rpm con sustratos complementados con dextrano sulfatado al 0,5 %). Por ello se decidió utilizar condiciones más restrictivas (27 °C y 900 rpm, con sustratos complementados con dextrano sulfatado al 0,05%). En estas nuevas condiciones, no todas las semillas propagaron en todas las proteínas recombinantes lo que permitió poner en evidencia diferencias en su comportamiento (presentado el caso de la propagación a expensas de la proteína recombinante de topillo rojo con la mutación 109L como ejemplo, Figura 14A). Los diferentes experimentos se realizaron por duplicado e incluyendo controles sin semilla para limitar errores de interpretación debidos a eventos estocásticos de

espontaneidad. Así se aprecia que solo las semillas derivadas de CWD presentan capacidad de propagar a expensas de la proteína de topillo rojo 109M. Las semillas ust02 y ust09 mostraron capacidad de propagación en todas las proteínas recombinantes utilizadas, a excepción de la 109M. Por su lado, ust01 indujo el malplegamiento de las diferentes proteínas recombinantes excepto de las variantes con metionina y leucina, y la ust06 solo pudo ser propagada en sustratos de topillo rojo 109I 112M. Por último, la semilla ust05 dio lugar a la formación de PrP malplegada en todas las variantes a excepción de la 109M. Sin embargo, su patrón electroforético cambió al propagar a expensas de las proteínas de topillo rojo 109L, 109A y 109F apareciendo una banda de ~16kDa que no presentaba la semilla original (Figura 14B). En el caso de la proteína recombinante con la doble mutación de metionina (109M 112M), todas las semillas fueron capaces de propagar en ella a excepción de ust09 (Tabla 2).

Tabla 2. Resumen de los resultados de la caracterización bioquímica mediante la evaluación de la capacidad de propagación de cada semilla en distintos sustratos. ✓: semilla con capacidad de propagar a expensas de la proteína recombinante no homóloga. X: semilla que no presenta la capacidad de propagar a expensas de la proteína recombinante no homóloga. (*): indica propagación con cambio apreciable de patrón de movilidad electroforética.

Sustrato	Semilla						
	sst00	sst01	ust01	ust02	ust05	ust06	ust09
109M	✓	✓	X	X	X	X	X
109L	✓	✓	X	✓	✓*	X	✓
109A	✓	✓	✓	✓	✓*	X	✓
109V	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓
109F	✓	✓	✓	✓	✓*	X	✓
112M	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
109M 112M	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓
Ratón	✓	✓	✓	X	X	X	✓
Oveja	✓	✓	X	X	X	X	X

3.2 Evaluación de la capacidad propagativa de las distintas cepas recombinantes a expensas de PrP recombinante de otras especies

Dado que diferentes cepas priónicas presentan una capacidad de infectar o no a diferentes especies, se utilizaron proteínas recombinantes de ratón silvestre y de oveja M112I (con mutación puntual de una isoleucina en posición 112) como posible parámetro capaz de diferenciar las semillas, esta vez con secuencias que presentan mayores diferencias con la secuencia aminoacídica de la semilla, pudiendo ser más restrictivos al distinguir características de cepa.

De las semillas seleccionadas, sst00 y sst01 son capaces de propagar a expensas de ambas proteínas recombinantes, ratón y oveja. El resto de semillas no es capaz de generar el malplegamiento de la

RESULTADOS

proteína de oveja y solo las semillas ust09 y ust01 consiguen propagar en sustrato con proteína de ratón recombinante (Tabla 2).

4. Aplicación del panel de pruebas bioquímicas a un nuevo grupo de PrP recombinantes malplegadas para su caracterización y clasificación

Una vez generado un panel de pruebas capaz de poner en evidencia las diferencias existentes entre las diferentes semillas generadas por PMSA y que podrían ser una muestra representativa de la variedad de cepas que pueden obtenerse mediante esta metodología, quisimos evaluar si era aplicable a nuevos productos de PMSA malplegados espontáneamente para su caracterización y clasificación como posibles cepas diferentes o similares a las generadas previamente.

4.1 Generación de PrP recombinantes malplegadas diferente origen mediante cambios en el entorno de propagación

Las nuevas semillas a las que se pretende aplicar el panel de pruebas bioquímicas adaptadas a PMSA y a sustrato de dextrano sulfatado a partir de diferentes orígenes (Figura 15A). Para ello, se generaron previamente de manera espontánea PrP malplegadas recombinantes de topillo rojo en entorno de homogeneizado de cerebro en PMCA, que luego fueron adaptados o seleccionados mediante propagación en sustratos complementados con diferentes cofactores (plásmido, ARN, dextrano sulfatado) o sin cofactores (245). A partir de las diferentes semillas obtenidas en los sustratos complementados con diferentes cofactores y sin ellos, se procedió a la adaptación de las semillas a PMSA en sustrato complementado con dextrano sulfatado mediante diversos pases seriados. Las diferentes semillas obtenidas tras la adaptación a PMSA se nombraron como “st” (del inglés, *strain*) y una letra, en lugar de un número para diferenciarlas de las semillas obtenidas espontáneamente en PMSA. Finalmente, atendiendo al patrón electroforético de las diferentes semillas, se seleccionaron 3 como representativos de la variabilidad de patrones electroforéticos obtenidos, para un estudio más detallado de sus características: stA, stB y stK (Figura 15B).

Las semillas stA y stK proceden de la misma semilla recombinante obtenida en entorno de homogeneizado de encéfalo. Esta semilla fue adaptada a propagar en sustrato complementado con dextrano sulfatado directamente en el caso de la semilla stA. En el caso de la semilla stK, esta fue previamente propagada en sustrato complementado con ARN y posteriormente adaptada al sustrato de dextrano sulfatado. La semilla stB, por su parte, procede de otra semilla recombinante diferente, originada por espontaneidad en sustrato de homogeneizado de encéfalo y posteriormente adaptada a PMSA y a sustrato de dextrano sulfatado, todo ello, con el objetivo de generar la máxima

variabilidad posible entre las PrP malplegadas recombinantes, pero en un entorno de propagación final comparable.

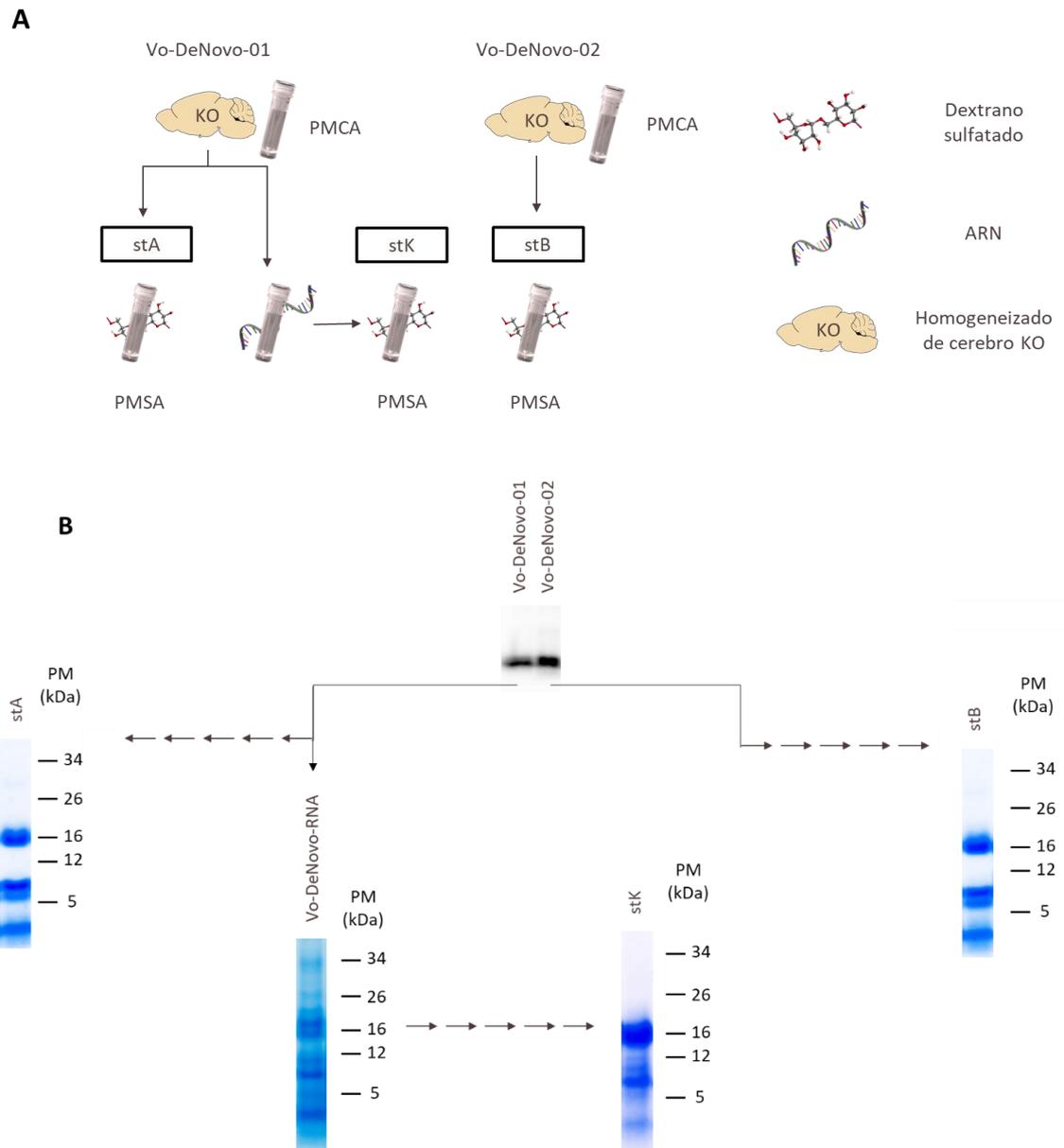


Figura 15. Generación de proteínas recombinantes malplegadas resistentes a proteasa de forma espontánea en PMCA y su adaptación a PMSA. A) Esquema del origen de las diferentes semillas obtenidas a partir del malplegamiento espontáneo con homogeneizado de cerebro KO y PrP recombinante de topillo rojo en PMCA y su posterior adaptación a PMSA con dextrano sulfatado como cofactor, ya sea de manera directa (stA y stB) o con procesos intermedios de adaptación a ARN (stK). B) Patrones de movilidad electroforética tras la digestión con proteinasa K (25 µg/ml, 42 °C, 1 h) de diferentes puntos de la adaptación. Los resultados fueron analizados mediante *Western blot* (VoDeNovo-01 y VoDeNovo-02) revelados con el anticuerpo SAF83, o mediante SDS-PAGE y tinción de proteína total, dando lugar a las semillas stA, stB y stK. PM: Marcador de peso molecular.

RESULTADOS

En cuanto al patrón electroforético, las tres semillas presentan una banda de ~16 kDa, acompañada por un doblete central (~9 kDa y ~6 kDa) en el caso de las semillas stA y stB, y de un patrón difuso de bandas de menor tamaño en el caso de la semilla stK (Figura 16).

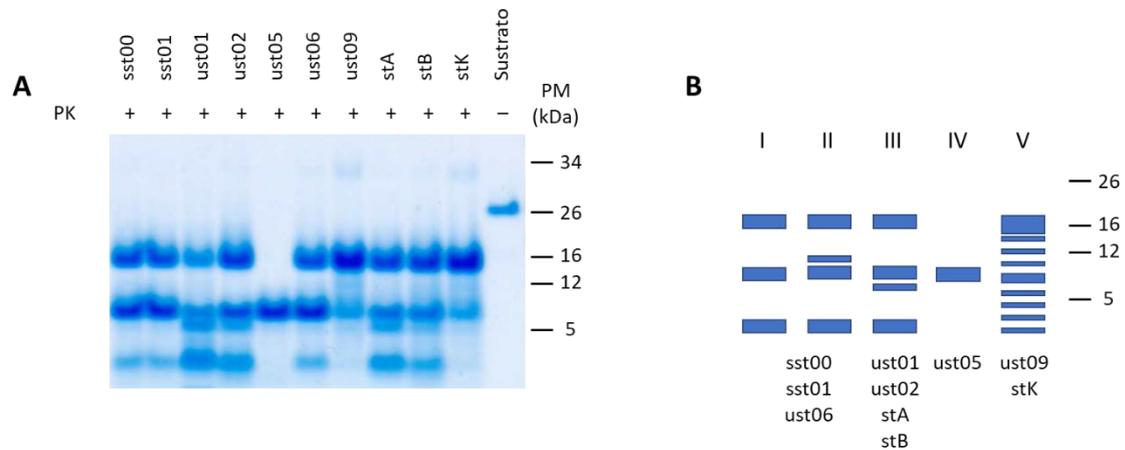


Figura 16. Patrones de movilidad electroforética de las semillas seleccionadas. A) Análisis comparativo de los patrones de movilidad electroforética mediante digestión con proteinasa K (25 µg/ml, 42 °C, 1 h), SDS-PAGE y tinción de proteína total de las semillas seleccionadas como potenciales confórmers debido a sus patrones distintivos tras su estabilización en PMSA. B) Representación esquemática de los patrones de movilidad electroforética de las semillas seleccionadas, en las que se distinguen cinco patrones diferentes (I a V) en función de la presencia o ausencia de las bandas de ~16 kDa, ~11 kDa, ~6 kDa o de fragmentos en forma de un patrón difuso y entre las que pueden clasificarse las diez semillas seleccionadas. PK: Proteinasa K. PM: Marcador de peso molecular.

4.2 Análisis mediante microscopía electrónica de transmisión y tinción negativa

Las semillas stA, stB y stK fueron preparadas siguiendo el mismo protocolo que las semillas anteriores y se visualizaron al microscopio electrónico mediante tinción negativa para determinar si formaban fibras y si su organización ultraestructural podría contribuir a establecer similitudes o diferencias respecto a las semillas estudiadas inicialmente.

Las tres muestras presentan fibras en las micrografías, normalmente agrupadas en haces o grupos de haces muy similares a las observadas para sst00, sst01 y ust01 (Figura 17).

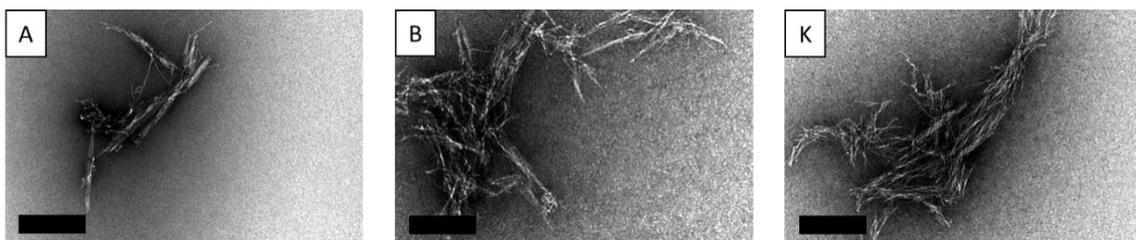


Figura 17. Micrografías de las fibras de PrP recombinante malplegada observadas en cada semilla mediante microscopía electrónica de transmisión. Todas las muestras fueron previamente centrifugadas con un colchón de sacarosa

al 30 % y digeridas con proteinasa K (25 µg/ml, 42 °C, 30 min). Finalmente se prepararon mediante tinción negativa con acetato de uracilo. A) stA, B) stB, C) stK. Todas las semillas presentan formaciones fibrilares. Las barras negras inferiores tienen un tamaño de 500 nm.

4.3 Caracterización bioquímica de las nuevas PrP malplegadas seleccionadas

4.2.1 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PROPAGATIVA DE LAS NUEVAS SEMILLAS RECOMBINANTES A EXPENSAS DE PRP DE TOPILLO ROJO CON MUTACIONES PUNTUALES

De la misma forma que las semillas obtenidas inicialmente, estas tres nuevas muestras fueron sometidas a una serie de pruebas bioquímicas que buscaban caracterizarlas en base a su capacidad diferencial para propagar a expensas de PrP recombinante de topillo rojo con mutaciones puntuales respecto a la semilla original. Para ello se utilizaron partículas esféricas de zirconio-sílice de 1 mm cargadas con las semillas stA, stB y stK como inóculo de experimentos de PMSA, realizados por duplicado para controlar la posible variabilidad del proceso y acompañados de controles no inoculados para descartar eventos estocásticos de malplegamiento espontáneo.

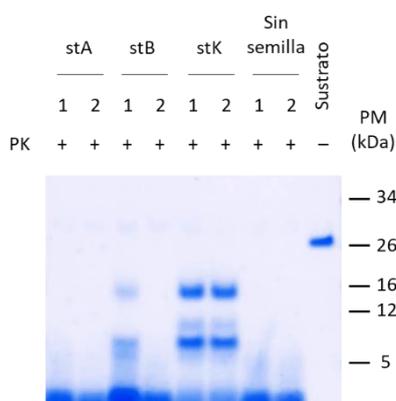


Figura 18. Ejemplos representativos de los experimentos realizados para el análisis bioquímico de las semillas seleccionadas. Ejemplo de caracterización de la capacidad de propagación en 24 h de PMSA de las distintas semillas en un sustrato con proteína recombinante de topillo rojo con la mutación 109L complementado con dextrano sulfatado. La capacidad de propagación de cada semilla se evaluó por duplicado (tubos 1 y 2) y los productos de PMSA fueron digeridos con proteinasa K (25 µg/ml, 42°C, 1h) y visualizados mediante electroforesis en SDS-PAGE y tinción de proteína total. Como se puede observar, la semilla stA no genera productos resistentes a la digestión por proteasas (y por lo tanto se considera que no consigue propagar a expensas de esta proteína), mientras que las semillas stB y stK presentan al menos una réplica con material resistente a proteasas (considerándose como positivo). PM: Marcador de peso molecular.

Las tres semillas nuevas mostraron la capacidad de propagar a expensas de proteína recombinante de topillo rojo con las mutaciones puntuales 109A, 109V, 109F y 112M, así como en la proteína con la doble mutación de metionina 109M 112M. No obstante, se observaron diferencias en cuanto a su capacidad de propagación en las variantes 109M, en la que solo stK fue capaz de propagar y 109L (Figura 18), que pudo ser malplegada por stB y stK como semillas, pero no por stA (Tabla 3).

RESULTADOS

Tabla 3. Resumen de los resultados de la caracterización bioquímica mediante la evaluación de la capacidad de propagación de cada semilla en distintos sustratos. ✓: semilla con capacidad de propagar a expensas de la proteína recombinante no homóloga. X: semilla que no presenta la capacidad de propagar a expensas de la proteína recombinante no homóloga.

Sustrato	Semilla		
	stA	stB	stK
109M	X	X	✓
109L	X	✓	✓
109A	✓	✓	✓
109V	✓	✓	✓
109F	✓	✓	✓
112M	✓	✓	✓
109M 112M	✓	✓	✓
Ratón	✓	✓	✓
Oveja	X	X	X

4.2.2 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PROPAGATIVA DE LAS SEMILLAS RECOMBINANTES A EXPENSAS DE PRP DE OTRAS ESPECIES

Siguiendo el panel de pruebas previamente realizado, las semillas stA, stB y stK fueron utilizadas en experimentos de PMSA para comprobar si eran capaces malplegar las proteínas recombinantes de ratón y de oveja, que presentan mayores diferencias en la secuencia aminoacídica que simples mutaciones puntuales.

El resultado en este caso es igual para estas tres semillas, ya que todas son capaces de propagar a expensas de la proteína de ratón, pero ninguna es capaz de malplegar la proteína de oveja (Tabla 3).

5. Análisis cuantitativo de la variedad de cepas generadas

Tomando en conjunto todas las semillas de los apartados anteriores, se realizó un análisis de similitud utilizando los resultados de la caracterización bioquímica de cada una de ellas. Para este análisis se empleó el coeficiente de similitud de Rand (SMC, del inglés *Simple Matching Coefficient*) que requiere primero de la generación de una matriz booleana. Para ello se tomaron los resultados de la caracterización bioquímica y se otorgó el valor de 1 cuando la semilla era capaz de propagar a expensas de la proteína analizada en las diversas pruebas, y de 0 cuando no (Tabla 4A).

De esta forma se obtuvo una segunda matriz con los diferentes resultados de SMC que indican la similitud entre las diferentes semillas, siendo 1 el valor máximo y que indica que ambas semillas son indistinguibles según el panel de pruebas planteado y 0 cuando no tienen absolutamente ninguna

característica en común (Tabla 4B). Con estos datos, podemos concluir que las semillas sst00 y sst01 son indistinguibles, así como las semillas stA y ust01. La semilla con los valores más bajos y por lo tanto la más dispar del resto es ust06. Por otro lado, presentan una gran similitud la semilla stB con stA, ust01 y ust02 (con valores de SMC por encima de 0,90, 0,90 y 0,81 respectivamente), así como las semillas stK y ust09 (SMC = 0,90).

Partiendo de esta tabla de resultados, se puede realizar un árbol de decisión basado en similitudes que permita saber ante qué tipo de semilla nos encontramos en función de sus características bioquímicas (Figura 19).

Tabla 4. Análisis matemático de las semillas seleccionadas. En la parte superior se observa la matriz booleana obtenida a partir de la caracterización bioquímica en base a la capacidad propagativa diferencial de las semillas a expensas de proteínas recombinantes no homólogas y el patrón de movilidad electroforética. En la parte inferior se reflejan los valores de SMC resultantes del análisis de similitud de las distintas semillas. El valor de SMC varía entre 0 y 1, siendo 0 totalmente diferentes y 1 indistinguibles según el análisis bioquímico realizado. El gradiente de colores corresponde a la mayor (verde) o menor (rojo) similitud en base al valor de SMC.

A

PRUEBA	sst00	sst01	ust01	ust02	ust05	ust06	ust09	stA	stB	stK
109M	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
109L	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1
109A	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
109V	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
109F	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
112M	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
109M 112M	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
Banda ~11 kDa	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1
Banda ~6kDa	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1
Banda ~16 kDa	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Ratón	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
Oveja	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0

B

SEMILLAS	sst00	sst01	ust01	ust02	ust05	ust06	ust09	stA	stB	stK	SEMILLAS
sst00		1	0,545455	0,454545	0,545455	0,363636	0,727273	0,545455	0,636364	0,818182	sst00
sst01			0,545455	0,454545	0,545455	0,363636	0,727273	0,545455	0,636364	0,818182	sst01
ust01				0,727273	0,636364	0,454545	0,818182	1	0,909091	0,727273	ust01
ust02					0,727273	0,363636	0,727273	0,727273	0,818182	0,636364	ust02
ust05						0,454545	0,636364	0,636364	0,727273	0,545455	ust05
ust06							0,454545	0,454545	0,363636	0,363636	ust06
ust09								0,818182	0,909091	0,909091	ust09
stA									0,909091	0,727273	stA
stB										0,818182	stB
stK											stK

RESULTADOS

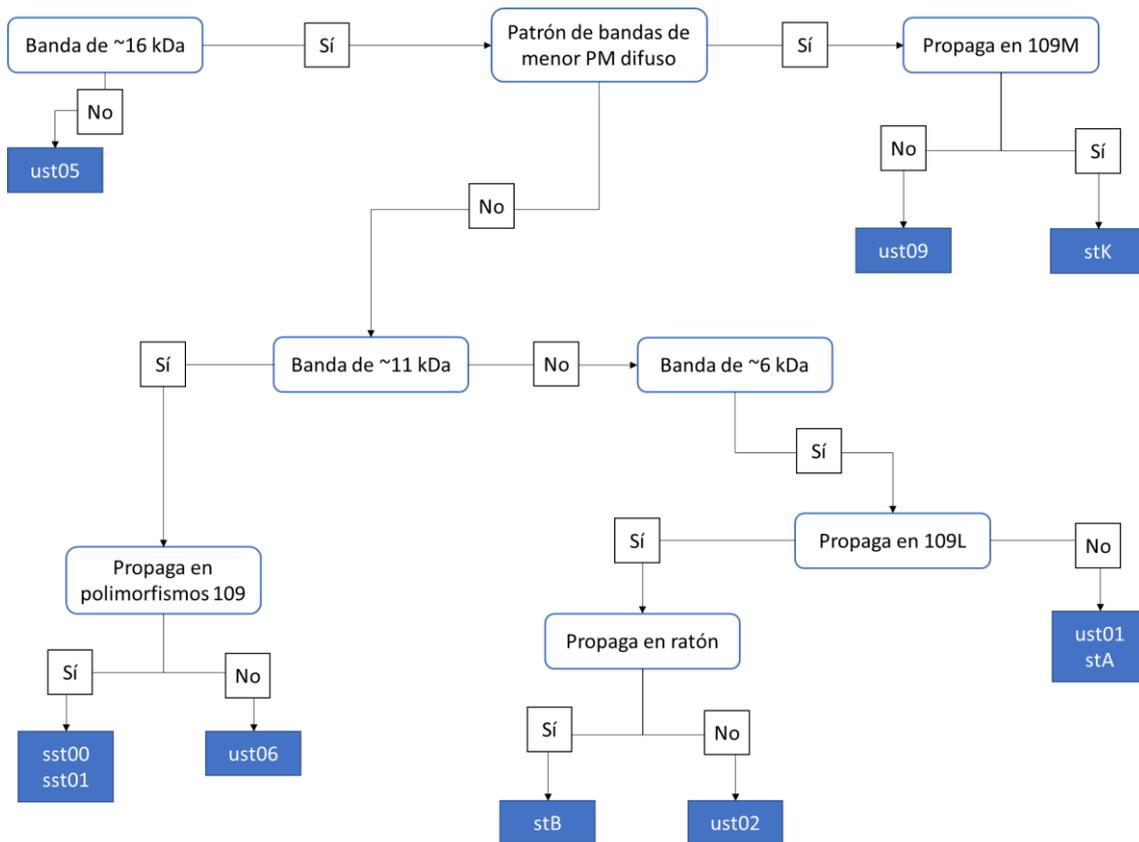


Figura 19. Árbol de decisión para la determinación rápida de las semillas seleccionadas basado en los datos de SMC obtenidos según su caracterización bioquímica.

6. Modificación de cepas priónicas mediante alteraciones en el entorno de propagación *in vitro*

Dado que el panel desarrollado para la caracterización bioquímica de las distintas semillas recombinantes de topillo rojo nos permite distinguir y clasificar rápidamente las proteínas recombinantes malplegadas, se decidió aplicarlo al estudio de la posible modificación de las características de cepa mediante alteraciones en el entorno de propagación. Así, las semillas previamente caracterizadas se sometieron a PMSA con diferentes alteraciones en el sustrato, como la adición de caotrópicos para su desestabilización o la ausencia del cofactor dextrano sulfatado para tratar de discernir su papel en la determinación de las características de cepa (Figura 20). Una vez propagadas en el nuevo entorno, se devolvieron al sustrato original y se estudiaron mediante el panel desarrollado para determinar si sus propiedades se habían visto alteradas.

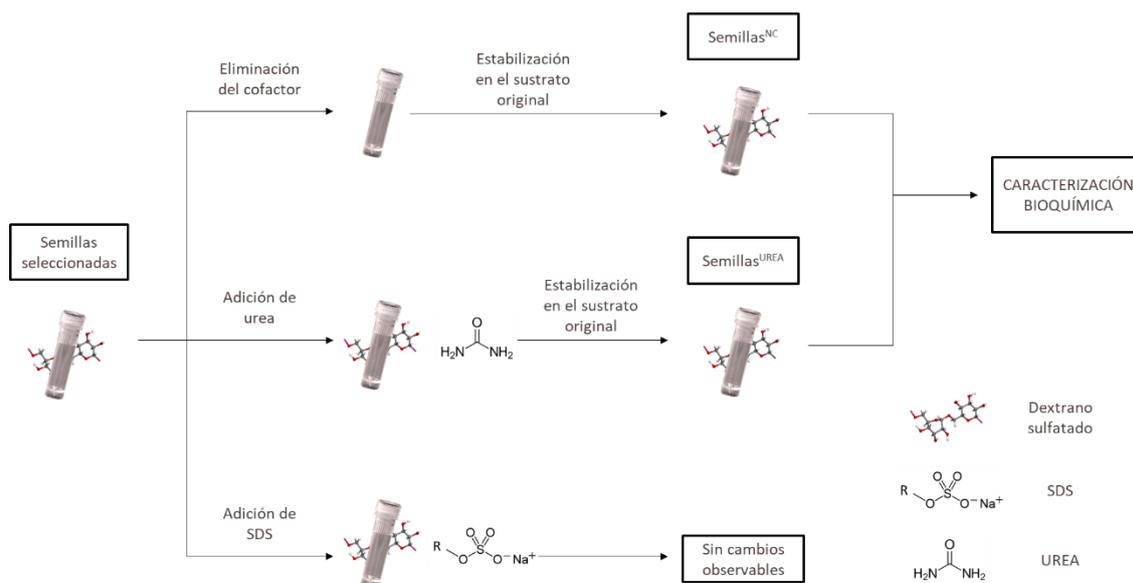


Figura 20. Esquema de los procesos empleados para la potencial modificación de las semillas recombinantes obtenidas. Como se describe en el esquema, se han abordado dos estrategias diferentes: eliminar el cofactor y añadir agentes caotrópicos (SDS y urea) al sustrato de propagación. Los productos de la propagación en SDS no presentaron cambios observables. Los productos obtenidos en tras la eliminación del cofactor y tras la propagación en urea presentaban cambios en el patrón de movilidad electroforética que hacían sospechar de alteraciones en la estructura y, en consecuencia, en las propiedades bioquímicas. Previa a su caracterización y para evitar resultados artefactuales por el cambio del entorno químico (carente de cofactor o con presencia de agente caotrópico), se procedió a volver a adaptar las semillas en el sustrato original con dextrano sulfatado.

6.1 Efecto de la presencia de agentes caotrópicos en el entorno de propagación como inductor de alteraciones en las propiedades de las cepas priónicas

Tratando de encontrar diferentes formas de alterar las características de las diez semillas seleccionadas, se decidió analizar el efecto de diferentes agentes caotrópicos en la estabilidad de las mismas, ya que su presencia puede desestabilizar o flexibilizar las estructuras, permitiendo que las semillas adquieran conformaciones (y, por lo tanto, propiedades) distintas. Estos cambios, además, podrían ser transmisibles al revertir la propagación al sustrato original con dextrano sulfatado sin el agente caotrópico.

Para ello, las semillas en formato sólido (cargadas en partículas esféricas de zirconio-sílice) se utilizaron para una primera ronda de PMSA con sustrato de dextrano sulfatado complementado con dos agentes caotrópicos diferentes: SDS y urea.

RESULTADOS

6.1.1 PROPAGACIÓN DE LAS CEPAS PRIÓNICAS SELECCIONADAS EN SUSTRATO COMPLEMENTADO CON SDS

En el caso del SDS, se emplearon diferentes concentraciones que variaban entre 0.01 % y 0.10 %, tratando de encontrar una concentración en la que la propagación no se viera impedida por el exceso de detergente, pero que permitiera la alteración de las semillas. Tras esta primera ronda de PMSA se realizaron otras tres rondas con diluciones seriadas de la semilla en proporción 1:100 con el fin de evaluar la estabilidad en sustratos con SDS.

Todas las semillas, sin excepción, propagaron de forma estable en los sustratos con 0.01 %, 0.02 % y 0,05 %, mientras que fallaban al propagar en sustratos con 0,10 % de SDS en los que se perdía la PrP recombinante malplegada resistente a PK. Los patrones electroforéticos de las semillas originales propagadas en SDS se mantenían inalterables respecto a los patrones electroforéticos observados cuando se propagan en sustratos sin SDS (ejemplo de ello es la propagación de ust09 en la Figura 21), a excepción de la semilla ust05, cuyo patrón variaba, adquiriendo una doble banda central (~9 kDa y ~6 kDa) y una banda de ~16 kDa inexistente en la semilla original.

Debido a que, con excepción de la ust05, no se apreciaron cambios en ninguna de las semillas, se decidió no continuar con el uso de SDS para su alteración.

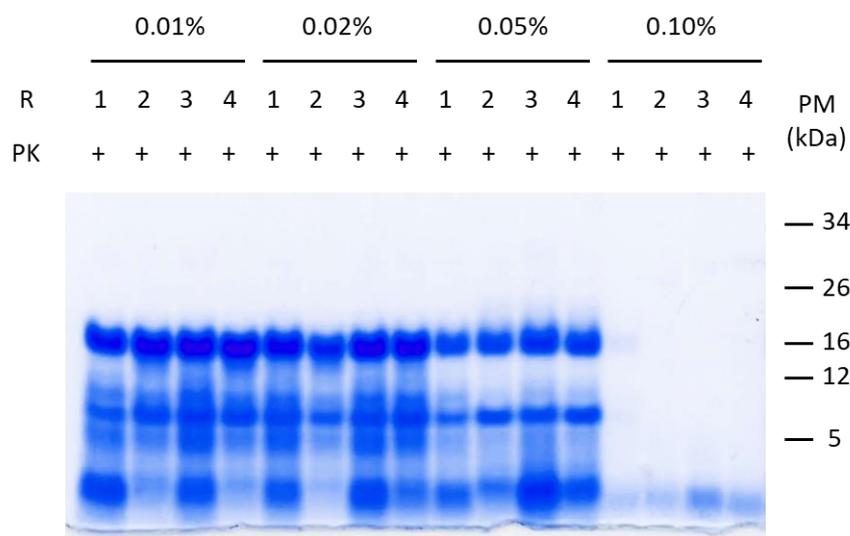


Figura 21. Ejemplo representativo de la capacidad de propagación de la semilla seleccionadas en sustratos complementados con SDS en concentración variable. Se expone la propagación de la semilla ust09 en diferentes sustratos complementados con SDS (0.01-0.10 %). Los productos de las 4 rondas seriadas de PMSA (R 1 a 4) fueron digeridos con proteinasa K (25 µg/ml, 42 °C, 1 h) y analizados mediante SDS-PAGE y tinción de proteína total. En todas las semillas se aprecia capacidad de propagar a expensas de la proteína recombinante en concentraciones de hasta 0,05% de SDS, manteniendo el patrón de movilidad electroforética característico de cada semilla. PM: Marcador de peso molecular.

6.1.2 PROPAGACIÓN DE LAS CEPAS PRIÓNICAS SELECCIONADAS EN SUSTRATO COMPLEMENTADO CON UREA

Al igual que con los sustratos complementados con SDS, las diez semillas seleccionadas fueron propagadas en sustratos complementados con urea. Sin embargo, la presencia de urea en el sustrato facilitaba la formación espontánea de confórmeros resistentes a PK (Figura 22A), por lo que primero comprobamos si se podía diferenciar la espontaneidad de la propagación inducida por nuestras semillas de elección, así como evaluar si la presencia de urea en el sustrato afectaba a la digestión con PK, ya que la observación de los patrones de movilidad electroforética tras la proteólisis es el primero de los indicadores de diferencias inducidas por el medio de propagación. Partiendo de un sustrato complementado con 4 M de urea, se realizó un análisis de la formación de PrP malplegada espontáneamente y del efecto de la urea durante la digestión, comparado con el efecto de la urea en la digestión de muestras propagadas en sustratos sin urea (Figura 22B). Para ello se realizó una ronda de PMSA con sustrato de dextrano sulfatado complementado con urea 4 M y se digirió de dos formas diferentes: añadiendo PK a la muestra y digiriendo según el protocolo descrito; y en paralelo, dializando la muestra frente a PBS para retirar la urea y añadiendo la PK y digiriendo según el mismo protocolo posteriormente. Para poder comparar los patrones electroforéticos, también se realizó una ronda de PMSA con sustrato de dextrano sulfatado inoculado con stA. El resultado de esta PMSA fue digerido de tres maneras diferentes: i) añadiendo la PK directamente siguiendo el protocolo descrito; ii) añadiendo urea a la muestra hasta una concentración final de 4 M para poder analizar el efecto de la urea durante la digestión, y iii) dializando esta muestra a la que se añadió urea para comprobar que la diálisis frente a PBS no alteraba el resultado de la digestión. Como resultado, se puede comprobar que el patrón electroforético de las muestras obtenidas espontáneamente en sustratos con urea es claramente distinguible de las muestras con propagación de las semillas. La semilla generada espontáneamente en urea muestra una sola banda predominante, ligeramente superior a los 16 kDa y ninguna de las bandas de menor tamaño que sí son observables en el resto de semillas. En cuanto al efecto de la urea en la digestión, parece alterar el corte de la PK generando fragmentos de mayor tamaño (observables en la muestra stA-DxS Urea+PK de la Figura 22B), pero que aun así es claramente distinto del patrón de la PrP malplegada espontáneamente por efecto del caotrópico.

Una vez asegurado que podían diferenciarse ambos productos de PMSA, el espontáneo inducido por urea (caracterizado por una única banda de ~17 kDa) y el propagado a partir de las semillas seleccionadas en entornos con urea, se procedió a propagar éstas en los diferentes sustratos, utilizando una partícula esférica de zirconio sílice cargada con cada semilla como inóculo en la primera ronda de PMSA, seguida de otras dos rondas con diluciones 1:100 de la semilla para estabilizar las cepas en el nuevo entorno con urea. Para poder comparar con la espontaneidad intrínseca generada en PMSA cuando se utilizan sustratos complementados con urea, se llevaron en paralelo muestras sin inocular.

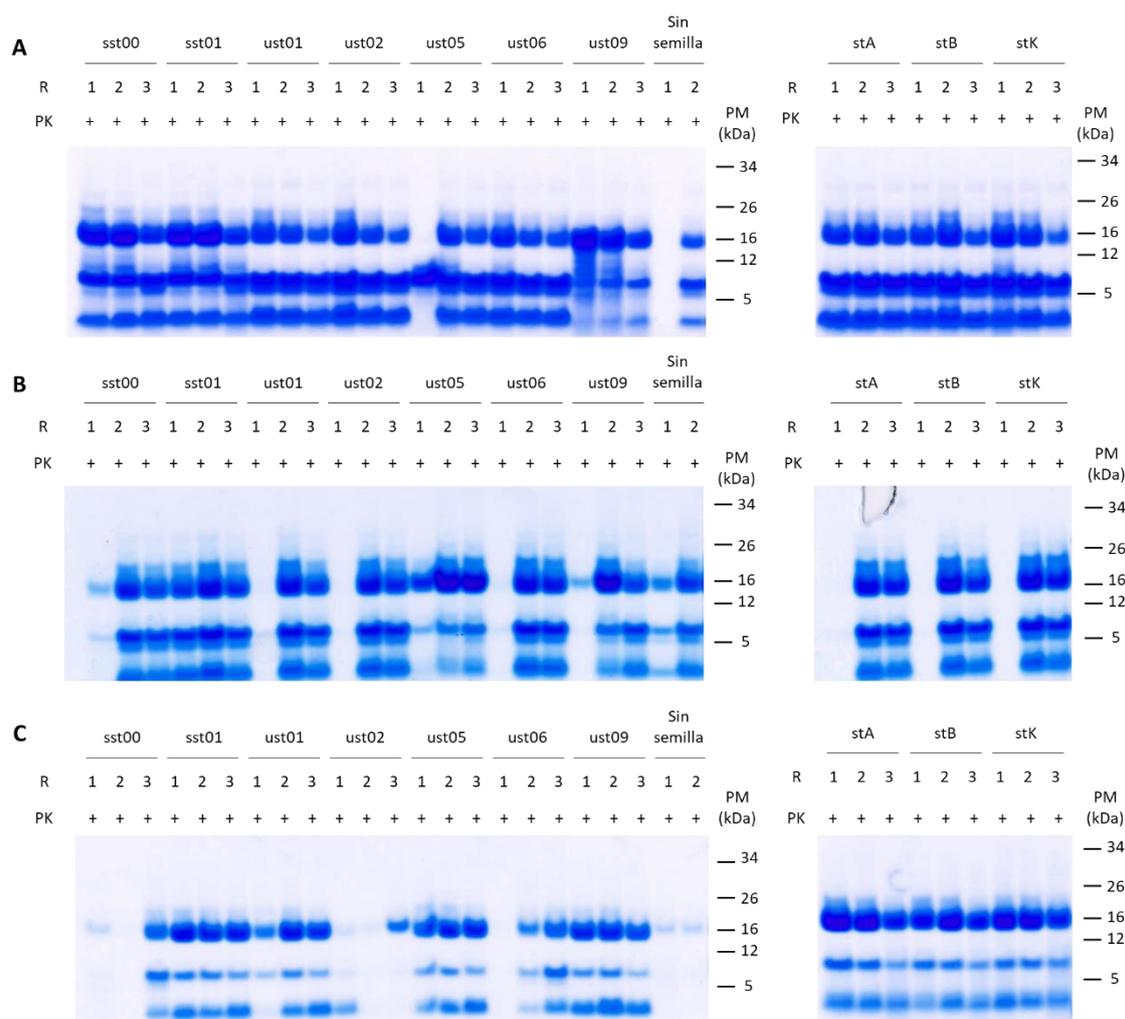


Figura 23. Propagación de las semillas seleccionadas en sustratos complementados con urea. A) Semillas propagadas en sustratos con 1 M de urea. B) Semillas propagadas en sustratos con 2 M de urea. C) Semillas propagadas en sustratos con 3 M de urea. Los productos de las 3 rondas seriadas de PMSA (R 1 a 3) fueron digeridos con proteinasa K (25 µg/ml, 42 °C, 1 h) y analizados mediante SDS-PAGE y tinción de proteína total. En todos los casos se añadió un control sin semilla para poder analizar el patrón de movilidad electroforética obtenido por malplegamiento espontáneo. PM: Marcador de peso molecular.

6.1.3 PROPAGACIÓN DE LAS CEPAS POTENCIALMENTE MODIFICADAS EN SU SUSTRATO ORIGINAL CON DEXTRANO SULFATADO

ORIGINAL CON DEXTRANO SULFATADO

Previo a su análisis bioquímico, las semillas obtenidas tras su propagación en urea 3 M fueron nuevamente llevadas a sustrato complementado con dextrano sulfatado para que estuvieran en las mismas condiciones que las semillas originales y los posibles cambios observados fuesen debidos a modificaciones adquiridas y no a un entorno de propagación alterado. Para la recuperación en dextrano sulfatado sin urea, se utilizaron partículas esféricas de zirconio sílice del último pase de 3 M de urea como semillas para una ronda inicial de PMSA con sustrato de dextrano sulfatado, seguido de otras dos rondas con diluciones 1:100 del producto de la ronda anterior para estabilizar la semilla. Para comprobar que el resultado final era homogéneo y poder analizar las diferencias con las semillas originales, las recuperadas se utilizaron también en formato sólido (cargadas en partículas de

RESULTADOS

zirconio sílice) para una PMSA con varias repeticiones que fueron digeridas y analizadas mediante SDS-PAGE junto con la semilla original (Figura 24). De esta forma pudimos comprobar que en muchas de las semillas se observa un cambio en el patrón electroforético, especialmente en cuanto a la presencia y/o ausencia de fragmentos intermedios (~11, ~9 y ~6 kDa). A estas semillas obtenidas tras la recuperación las denominamos con el superíndice “urea” para indicar que han pasado por un proceso de adaptación en sustratos complementados con urea 3 M.

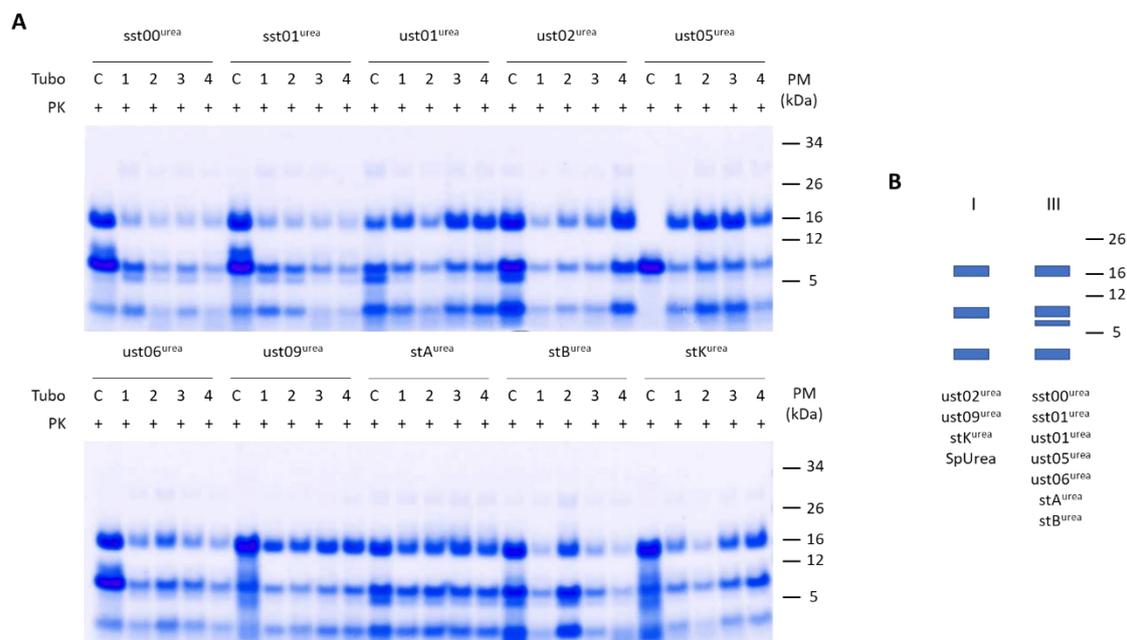


Figura 24. Propagación de cepas potencialmente modificadas en urea 3 M en su sustrato original con dextrano sulfatado. A) Comparación de los patrones de movilidad electroforética obtenidos tras la adaptación a dextrano sulfatado de las semillas^{urea} con sus semillas de origen (C). Los productos finales de la adaptación fueron analizados por cuadruplicado (réplicas marcadas con los números 1-4) en paralelo con el producto de la semilla original previo a la propagación en urea 3 M. Todas las muestras fueron digeridas con proteinasa K (25 µg/ml, 42 °C, 1 h) y analizadas mediante SDS-PAGE y tinción de proteína total. B) Representación esquemática de los patrones de movilidad electroforética observados en las semillas^{urea}, en las que se distinguen dos patrones diferentes en función de la presencia o ausencia de la banda de ~6 kDa. PM: Marcador de peso molecular.

La alteración de patrón más llamativa fue la de la semilla ust05^{urea} que mostró además la banda de 16 kDa, que hasta ahora no había presentado. Junto a estas semillas y para la caracterización, se utilizó también una semilla espontánea de 3M de urea (SpUr) que, tras la adaptación a dextrano sulfatado realizada igual que para el resto de las semillas, presentó un patrón electroforético compuesto por una banda de ~16 kDa, una de ~9 kDa y fragmentos de pequeño tamaño de ~3 kDa (Figura 24A). En general, se pueden apreciar dos patrones electroforéticos diferentes (Figura 24B). Si bien todas las muestras presentan una banda de ~16 kDa y fragmentos de ~3 kDa, en la parte central se observan diferencias referentes a la presencia o ausencia de una banda de ~6 kDa. Esta banda solo está presente en las semillas sst00^{urea}, sst01^{urea}, ust01^{urea}, ust05^{urea}, ust06^{urea}, stA^{urea} y stB^{urea}, mientras que en el resto de semillas solo es apreciable una banda de ~9 kDa.

6.1.4 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS CEPAS PRIÓNICAS TRAS SU POSIBLE MODIFICACIÓN

Tomando las pruebas bioquímicas realizadas a las semillas originales y en las mismas condiciones que ya se habían fijado en el apartado 3 de la presente sección de resultados, las semillas modificadas en urea fueron analizadas según su capacidad propagativa diferencial a expensas de proteínas de topillo rojo con mutaciones puntuales, así como en proteínas recombinantes de otras especies (ratón WT y oveja M112I). Los resultados mostraron claras diferencias respecto a las cepas previas a la modificación (Tabla 5).

Tabla 5. Resumen de los resultados de la caracterización bioquímica mediante la evaluación de la capacidad de propagación las semillas^{urea} en distintos sustratos. ✓: semilla con capacidad de propagar a expensas de la proteína recombinante no homóloga. X: semilla que no presenta la capacidad de propagar a expensas de la proteína recombinante no homóloga.

Sustrato	Semillas ^{urea}										
	sst00	sst01	ust01	ust02	ust05	ust06	ust09	stA	stB	stK	SpUr
109M	X	X	X	X	X	X	X	✓	X	X	X
109L	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
109A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
109V	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
109F	✓	✓	X	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓
112M	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓
109M 112M	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓
Ratón	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓
Oveja	X	X	X	X	X	✓	X	✓	✓	X	X

Todas las semillas utilizadas pudieron ser propagadas en sustratos que contenían las variantes 109L, 109A y 109V de la proteína de topillo rojo. En cambio, la única semilla que mostró capacidad de propagación a expensas de la variante 109M fue stA^{urea}. También se observaron diferencias en la capacidad propagativa en sustratos con proteínas de topillo rojo 109F (Figura 25A), donde ust01^{urea} y ust05^{urea} no pudieron ser propagadas tras la modificación inducida por su propagación en urea. En cuanto a la proteína de topillo rojo con el polimorfismo 112M, la única que no pudo inducir su malplegamiento fue la semilla ust09^{urea}. En cuanto al resto de semillas, cabe destacar que surgen patrones electroforéticos diferenciables: i) una sola banda de ~9 kDa en el caso de las proteína sst00^{urea}, ust01^{urea}, ust05^{urea}, ust06^{urea} y stK^{urea}, ii) un segundo patrón formado por una banda de ~16 kDa mucho más predominante que el resto de los fragmentos de menor tamaño, presente en ust02^{urea}, SpUr y que especialmente marcado en stA, iii) un patrón formado por bandas de ~16 kDa, de ~9 kDa y de menor tamaño en una proporción más equitativa, presente en stB^{urea}, y iv) sst01 que presenta el patrón más diferente del resto, caracterizado por una banda de ~16 kDa y un doblete de bandas de ~11 kDa y ~9 kDa (Figura 25B).

RESULTADOS

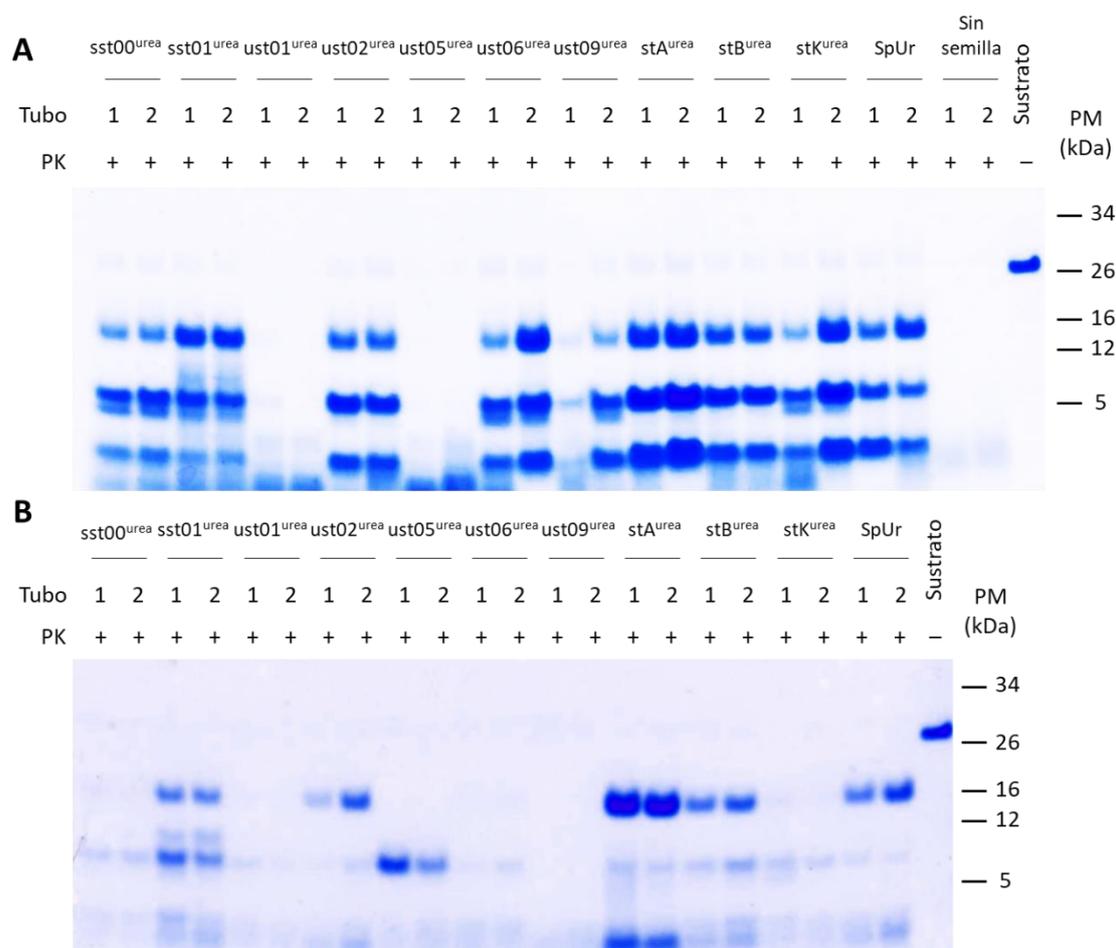


Figura 25. Ejemplos representativos de los experimentos realizados para el análisis bioquímico de las semillas^{urea}. Ejemplo de caracterización de la capacidad de propagación en 24 h de PMSA de las semillas^{urea} en un sustrato con proteína recombinante de topillo rojo con la mutación 109F (A) y 112M (B) complementado con dextrano sulfatado. La capacidad de propagación de cada semilla se evaluó por duplicado (tubos 1 y 2) y los productos de PMSA fueron digeridos con proteinasa K (25 ug/ml, 42°C, 1h) y visualizados mediante electroforesis en SDS-PAGE y tinción de proteína total. Como se puede observar, en el caso de la propagación en 109F (A), las semilla ust01^{urea} y ust05^{urea} no generan productos resistentes a la digestión por proteasas (y por lo tanto se considera que no consigue propagar a expensas de esta proteína), mientras que el resto presentan al menos una réplica con material resistente a proteasas (considerándose como positivo). PM: Marcador de peso molecular.

La propagación de las semillas en sustratos con proteínas recombinantes de ratón y de oveja también revelaron diferencias entre las semillas. Todas las semillas son capaces de propagar a expensas de la proteína de ratón a excepción de ust09^{urea}. En el caso de la proteína de oveja, esta solo se malpliega cuando es inoculada con ust06^{urea}, stA^{urea} y stB^{urea}, siendo el resto de semillas incapaces de propagar en ella (Tabla 5).

6.1.5 ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LAS CEPAS OBTENIDAS TRAS LA PROPAGACIÓN EN UREA

De la misma forma que con las semillas originales, las semillas obtenidas tras la propagación en urea se analizaron matemáticamente para ver las similitudes que presentan entre ellas. Para ello se llevó

a cabo el mismo procedimiento para obtener primero una matriz booleana a partir de la cual poder calcular los diferentes SMC (Tabla 6). De esta manera se deduce que las parejas de semillas sst00^{urea}-sst01^{urea}, ust05^{urea}-ust01^{urea}, ust06^{urea}-stB^{urea} y el conjunto de semillas ust02^{urea}-stK^{urea}-SpUR son indistinguibles con las pruebas realizadas, ya que tienen un SMC = 1. Sin embargo, este análisis solo tiene en cuenta la capacidad de propagar o no en los diferentes sustratos y algunas de estas parejas de semillas pueden diferenciarse por los patrones electroforéticos observados al ser propagadas en 112M (Figura 25B), donde sst00^{urea} y sst01^{urea} tienen patrones electroforéticos diferentes, así como stK^{urea} se diferencia de SpUR y ust02^{urea}.

Tabla 6. Análisis matemático de las semillas^{urea}. En la parte superior se observa la matriz booleana obtenida a partir de la caracterización bioquímica en base a la capacidad propagativa diferencial de las semillas a expensas de proteínas recombinantes no homólogas y el patrón de movilidad electroforética. En la parte inferior se reflejan los valores de SMC resultantes del análisis de similitud de las distintas semillas. El valor de SMC varía entre 0 y 1, siendo 0 totalmente diferentes y 1 indistinguibles según el análisis bioquímico realizado. El gradiente de colores corresponde a la mayor (verde) o menor (rojo) similitud en base al valor de SMC.

A

PRUEBA	sst00 ^{urea}	sst01 ^{urea}	ust01 ^{urea}	ust02 ^{urea}	ust05 ^{urea}	ust06 ^{urea}	ust09 ^{urea}	stA ^{urea}	stB ^{urea}	stK ^{urea}	SpUR
109M	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
109L	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
109A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
109V	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
109F	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1
112M	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
109M 112M	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
Banda ~11 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Banda ~6kDa	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0
Banda ~16 kDa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Ratón	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
Oveja	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0

B

SEMILLAS	sst00 ^{urea}	sst01 ^{urea}	ust01 ^{urea}	ust02 ^{urea}	ust05 ^{urea}	ust06 ^{urea}	ust09 ^{urea}	stA ^{urea}	stB ^{urea}	stK ^{urea}	SpUR	SEMILLAS
sst00 ^{urea}		1	0,909091	0,909091	0,909091	0,909091	0,636364	0,818182	0,909091	0,909091	0,909091	sst00 ^{urea}
sst01 ^{urea}			0,909091	0,909091	0,909091	0,909091	0,636364	0,818182	0,909091	0,909091	0,909091	sst01 ^{urea}
ust01 ^{urea}				0,818182	1	0,818182	0,545455	0,727273	0,818182	0,818182	0,818182	ust01 ^{urea}
ust02 ^{urea}					0,818182	0,818182	0,727273	0,727273	0,818182	1	1	ust02 ^{urea}
ust05 ^{urea}						0,818182	0,545455	0,727273	0,818182	0,818182	0,818182	ust05 ^{urea}
ust06 ^{urea}							0,545455	0,909091	1	0,818182	0,818182	ust06 ^{urea}
ust09 ^{urea}								0,454545	0,545455	0,727273	0,727273	ust09 ^{urea}
stA ^{urea}									0,909091	0,727273	0,727273	stA ^{urea}
stB ^{urea}										0,818182	0,818182	stB ^{urea}
stK ^{urea}											1	stK ^{urea}
SpUR												SpUR

Teniendo en cuenta todos estos datos, se puede realizar un árbol de decisión que permita la clasificación de las diferentes proteínas malplegadas de manera similar a como se realizó con las semillas originales (Figura 26).

RESULTADOS

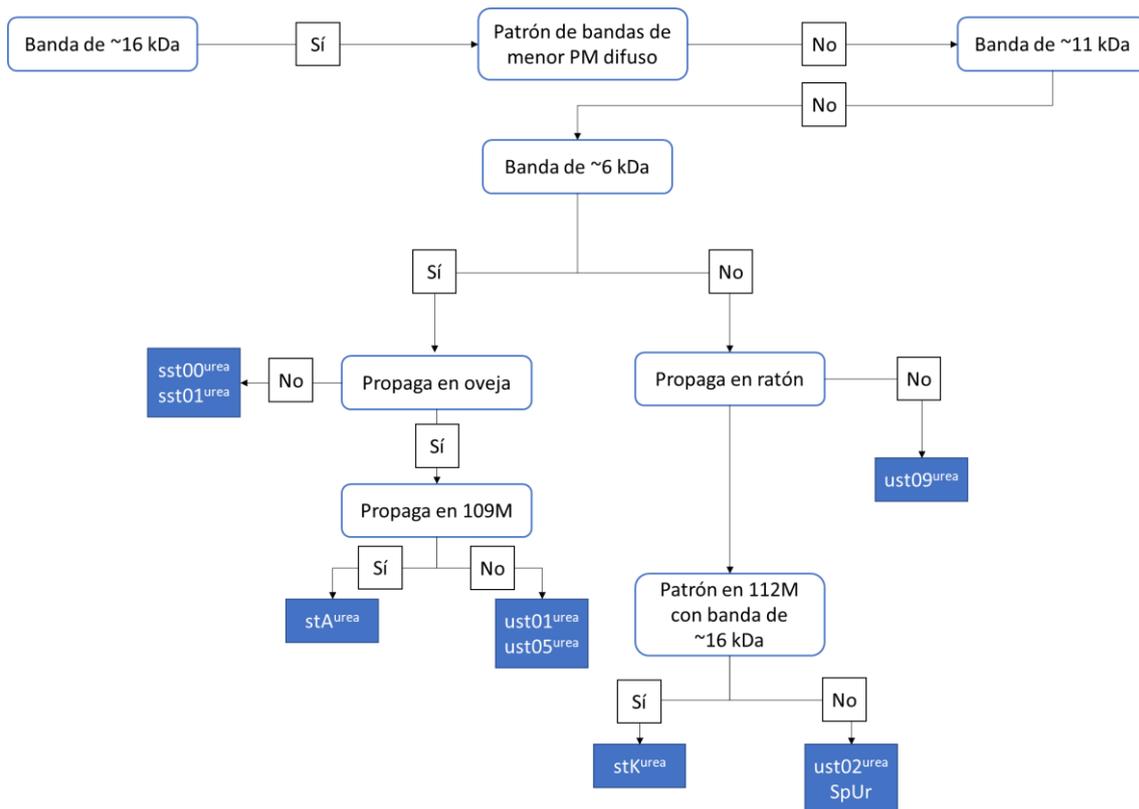


Figura 26. Árbol de decisión para la determinación rápida de las semillas^{urea} basado en los datos de SMC obtenidos según su caracterización bioquímica.

6.2 Efecto de la pérdida de cofactor en las propiedades de las cepas priónicas

Todas las cepas analizadas se produjeron o fueron adaptadas a sustratos complementados con dextrano sulfatado como cofactor. Surge pues la posibilidad de que la estabilidad y las características de estas semillas se deban solo y únicamente a la presencia del cofactor, por lo que se decidió evaluar si las características se modificaban al propagar y adaptar las semillas a sustratos sin cofactores.

6.2.1 PROPAGACIÓN DE LAS CEPAS PRIÓNICAS SELECCIONADAS EN SUSTRATO SIN COFACTORES

Para analizar el efecto de la ausencia de cofactor, se realizó una ronda de PMSA con partículas esféricas de zirconio-sílice cargadas con las diferentes semillas como inóculo y sustrato sin cofactores, formado únicamente por proteína recombinante de topillo rojo y solución de conversión. Para la estabilización de las cepas se realizaron otras dos rondas de PMSA diluyendo 1:100 el producto de la ronda anterior en cada una de ellas. Como resultado, las diez semillas seleccionadas fueron adaptadas a sustrato sin cofactores, viendo modificados sus patrones electroforéticos tras la estabilización final (Figura 27). En todos los casos se aprecia una pérdida de la banda de ~16 kDa,

resultando en un patrón uniforme e indistinguible entre las diferentes cepas formado solo por una banda de ~9 kDa y fragmentos de menor tamaño en patrón ligeramente difuso.

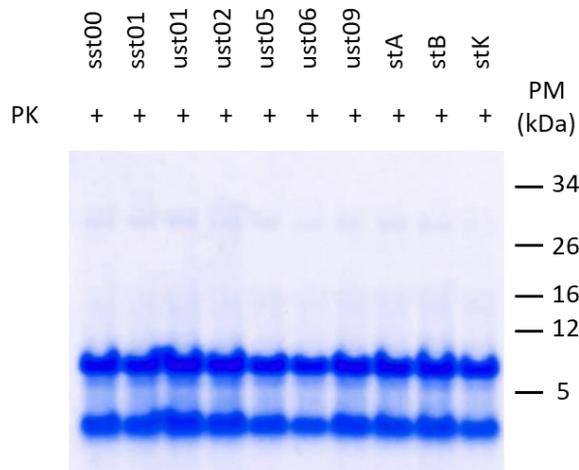


Figura 27. Propagación de las semillas seleccionadas en sustrato sin cofactor. Análisis del producto final de la adaptación de las semillas a sustrato sin cofactor. Las muestras fueron digeridas con proteinasa K (25 µg/ml, 42 °C, 1 h) y visualizadas mediante SDS-PAGE y tinción de proteína total, mostrando todas un patrón de movilidad electroforética similar y homogéneo carente de la banda de ~16 kDa. PM: Marcador de peso molecular.

6.2.2 PROPAGACIÓN DE LAS CEPAS POTENCIALMENTE MODIFICADAS EN SU SUSTRATO ORIGINAL CON DEXTRANO SULFATADO

Una vez más, antes de proceder al análisis bioquímico, las semillas adaptadas a un entorno sin cofactores se volvieron a propagar en sustrato de dextrano sulfatado para evitar resultados artefactuales en el análisis bioquímico de las mismas debidas a los diferentes entornos de propagación. Para la readaptación en sustrato con cofactores se utilizaron partículas esféricas de zirconio-sílice de la última ronda de PMSA realizada en sustrato sin cofactores como inóculo para una primera ronda de PMSA con dextrano sulfatado en el sustrato. A esta primera ronda, le sucedieron otras dos con diluciones 1:100 de los productos de las rondas previas para estabilizar la semilla. La comprobación de la homogeneidad del resultado final, así como el análisis del patrón electroforético se realizó mediante SDS-PAGE utilizando el mismo procedimiento descrito para las semillas adaptadas a urea 3 M. El resultado se visualizó junto con las semillas originales previas a la propagación en sustrato sin cofactores para poder comparar los cambios en los patrones electroforéticos (Figura 28). Las semillas obtenidas tras la propagación nuevamente en sustrato con dextrano sulfatado se denominaron con el superíndice "NC" (de no cofactor) para indicar que han pasado por un proceso de adaptación en sustrato sin cofactores.

Los patrones electroforéticos (Figura 28B) de los productos finales muestran una banda de ~16 kDa que va acompañada por fragmentos de menor tamaño, distinguiendo dos grupos de semillas con aspectos diferentes. Un primer grupo, conformado por las semillas sst00^{NC}, ust01^{NC}, ust02^{NC} y ust09^{NC} presenta fragmentos de menor tamaño en un patrón difuso sin bandas claramente definibles. Por el contrario, las semillas sst01^{NC}, ust05^{NC}, ust06^{NC}, stA^{NC}, stB^{NC} y stK^{NC} presentan dos bandas claras de ~9 y ~6 kDa.

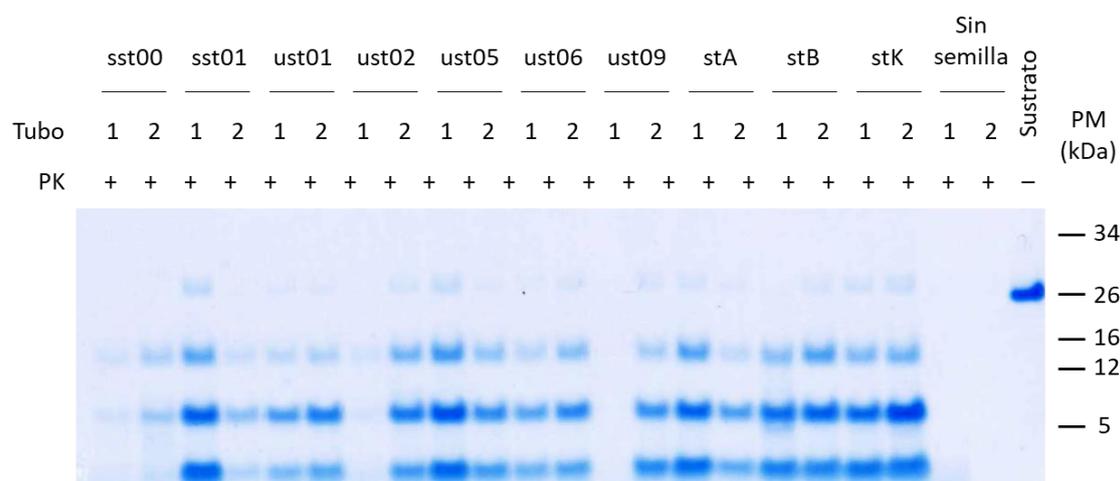


Figura 29. Ejemplo representativo de los experimentos realizados para el análisis bioquímico de las semillas^{NC}. Ejemplo de caracterización de la capacidad de propagación en 24 h de PMSA de las semillas^{urea} en un sustrato con proteína recombinante de topillo rojo con la mutación 109F complementado con dextrano sulfatado. La capacidad de propagación de cada semilla se evaluó por duplicado (tubos 1 y 2) y los productos de PMSA fueron digeridos con proteinasa K (25 ug/ml, 42°C, 1h) y visualizados mediante electroforesis en SDS-PAGE y tinción de proteína total. Como se puede observar, todas las semillas presentan al menos una réplica con material resistente a proteasas (considerándose como positivo). PM: Marcador de peso molecular.

Tabla 7. Resumen de los resultados de la caracterización bioquímica mediante la evaluación de la capacidad de propagación de las semillas^{NC} en distintos sustratos. √: semilla con capacidad de propagar a expensas de la proteína recombinante no homóloga. X: semilla que no presenta la capacidad de propagar a expensas de la proteína recombinante no homóloga.

Sustrato	Semillas ^{NC}									
	sst00	sst01	ust01	ust02	ust05	ust06	ust09	stA	stB	stK
109M	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
109L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
109A	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
109V	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
109F	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
112M	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
109M 112M	√	√	X	√	√	√	√	√	X	X
Ratón	√	√	√	√	√	√	X	√	√	√
Oveja	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

RESULTADOS

6.2.4 ANÁLISIS DE LAS CEPAS OBTENIDAS TRAS LA PROPAGACIÓN EN SUSTRATO SIN COFACTOR

Una vez analizadas las semillas tras la propagación en sustratos sin cofactor, se procedió a tratar los datos para su análisis y el cálculo de SMC de la misma manera que con las semillas anteriores (Tabla 8). Con las pruebas realizadas, encontramos diferentes grupos de semillas que son indistinguibles entre sí (SMC = 1): i) sst00^{NC} y ust02^{NC}, ii) sst01^{NC}, ust05^{NC}, ust06^{NC} y stA^{NC}, y iii) stB^{NC} y stK^{NC}. Las únicas que no son iguales a ninguna otra según las pruebas realizadas son ust01^{NC} y ust09^{NC}, si bien comparten muchas características con las otras semillas (SMC > 0,7).

Con estos datos se realizó un árbol de decisión que permitiera diferenciar fácilmente las diferentes semillas obtenidas, igual que se realizó en los apartados anteriores (Figura 30).

Tabla 8. Análisis matemático de las semillas^{NC}. En la parte superior se observa la matriz booleana obtenida a partir de la caracterización bioquímica en base a la capacidad propagativa diferencial de las semillas a expensas de proteínas recombinantes no homólogas y el patrón de movilidad electroforética. En la parte inferior se reflejan los valores de SMC resultantes del análisis de similitud de las distintas semillas. El valor de SMC varía entre 0 y 1, siendo 0 totalmente diferentes y 1 indistinguibles según el análisis bioquímico realizado. El gradiente de colores corresponde a la mayor (verde) o menor (rojo) similitud en base al valor de SMC.

A

PRUEBA	sst00 ^{NC}	sst01 ^{NC}	ust01 ^{NC}	ust02 ^{NC}	ust05 ^{NC}	ust06 ^{NC}	ust09 ^{NC}	stA ^{NC}	stB ^{NC}	stK ^{NC}
109M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
109L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
109A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
109V	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
109F	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
112M	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
109M 112M	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
Banda ~11 kDa	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0
Banda ~6kDa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Banda ~16 kDa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Ratón	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
Oveja	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

B

SEMILLAS	sst00 ^{NC}	sst01 ^{NC}	ust01 ^{NC}	ust02 ^{NC}	ust05 ^{NC}	ust06 ^{NC}	ust09 ^{NC}	stA ^{NC}	stB ^{NC}	stK ^{NC}	SEMILLAS
sst00 ^{NC}		0,909091	0,909091	1	0,909091	0,909091	0,909091	0,909091	0,818182	0,818182	sst00 ^{NC}
sst01 ^{NC}			0,818182	0,909091	1	1	0,818182	1	0,909091	0,909091	sst01 ^{NC}
ust01 ^{NC}				0,909091	0,818182	0,818182	0,818182	0,818182	0,909091	0,909091	ust01 ^{NC}
ust02 ^{NC}					0,909091	0,909091	0,909091	0,909091	0,818182	0,818182	ust02 ^{NC}
ust05 ^{NC}						1	0,818182	1	0,909091	0,909091	ust05 ^{NC}
ust06 ^{NC}							0,818182	1	0,909091	0,909091	ust06 ^{NC}
ust09 ^{NC}								0,818182	0,727273	0,727273	ust09 ^{NC}
stA ^{NC}									0,909091	0,909091	stA ^{NC}
stB ^{NC}										1	stB ^{NC}
stK ^{NC}											stK ^{NC}

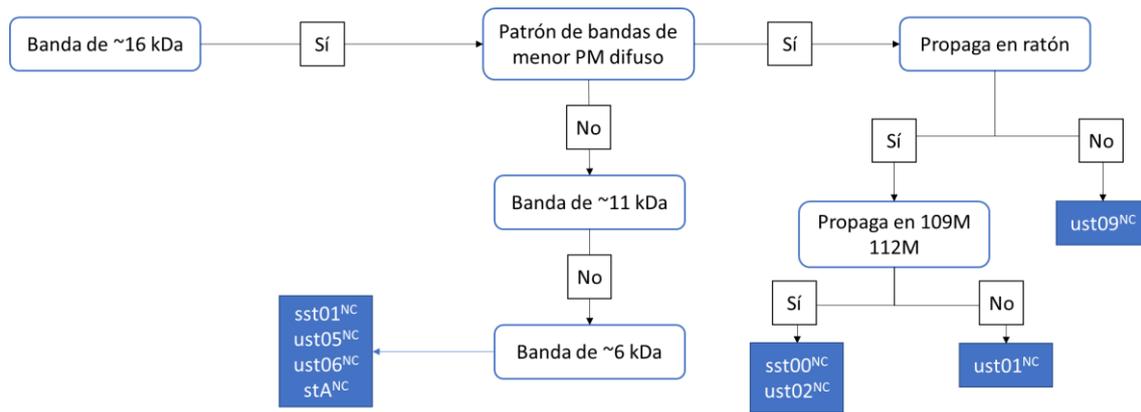


Figura 30. Árbol de decisión para la determinación rápida de las semillas^{NC} basado en los datos de SMC obtenidos según su caracterización bioquímica.

7. Análisis de la diversidad de semillas obtenidas y del efecto de su propagación en distintos entornos en las características de cepa

Las semillas originales, así como las proteínas recombinantes malplegadas obtenidas tras los procesos de propagación en urea y en sustrato sin cofactor, pueden ser analizadas en conjunto para determinar la variedad de semillas obtenidas utilizando los parámetros de la caracterización bioquímica para diferenciar entre ellas.

De esta manera se puede obtener una matriz booleana que unifique las tres matrices obtenidas para cada grupo de semillas (Tablas 4, 6 y 8) y realizar un análisis del SMC comparando todas las semillas y sus variantes tras las posibles modificaciones (Tabla 9). Con estos datos se puede observar qué semillas son indistinguibles según el panel de pruebas bioquímicas realizadas, siendo aquellas que tienen un SMC = 1. Con este criterio en común, encontramos diferentes grupos de semillas (algunos previamente expuestos en los correspondientes apartados) que son indistinguibles entre sí: i) sst00 y sst01, ii) ust01^{urea} y ust05^{urea}, iii) ust02^{urea} y SpUr, iv) sst00^{NC} y ust02^{NC}, iv) stB, sst00^{urea} y sst01^{urea} y v) el mayor grupo de todos formado por el conjunto de semillas ust01, stA, sst01^{NC}, ust05^{NC}, ust06^{NC} y stA^{NC}. Este último grupo además contiene la única semilla que no cambia sus características tras la eliminación del cofactor, ya que stA y stA^{NC} son indistinguibles con las pruebas realiza.

Con todo ello se puede pues realizar una estimación de la diversidad de semillas con características bioquímicas distinguibles por este método que se han conseguido, siendo estas un total de 17 y que se pueden agrupar y diferenciar entre ellas gracias a su perfil electroforético o a su capacidad de propagar o no a expensas de proteínas recombinantes diferentes de la semilla de origen (Figura 31). Comprobamos pues que se han generado un conjunto de herramientas suficientes para estudiar las características de cepas y el efecto del entorno de propagación sobre las mismas.

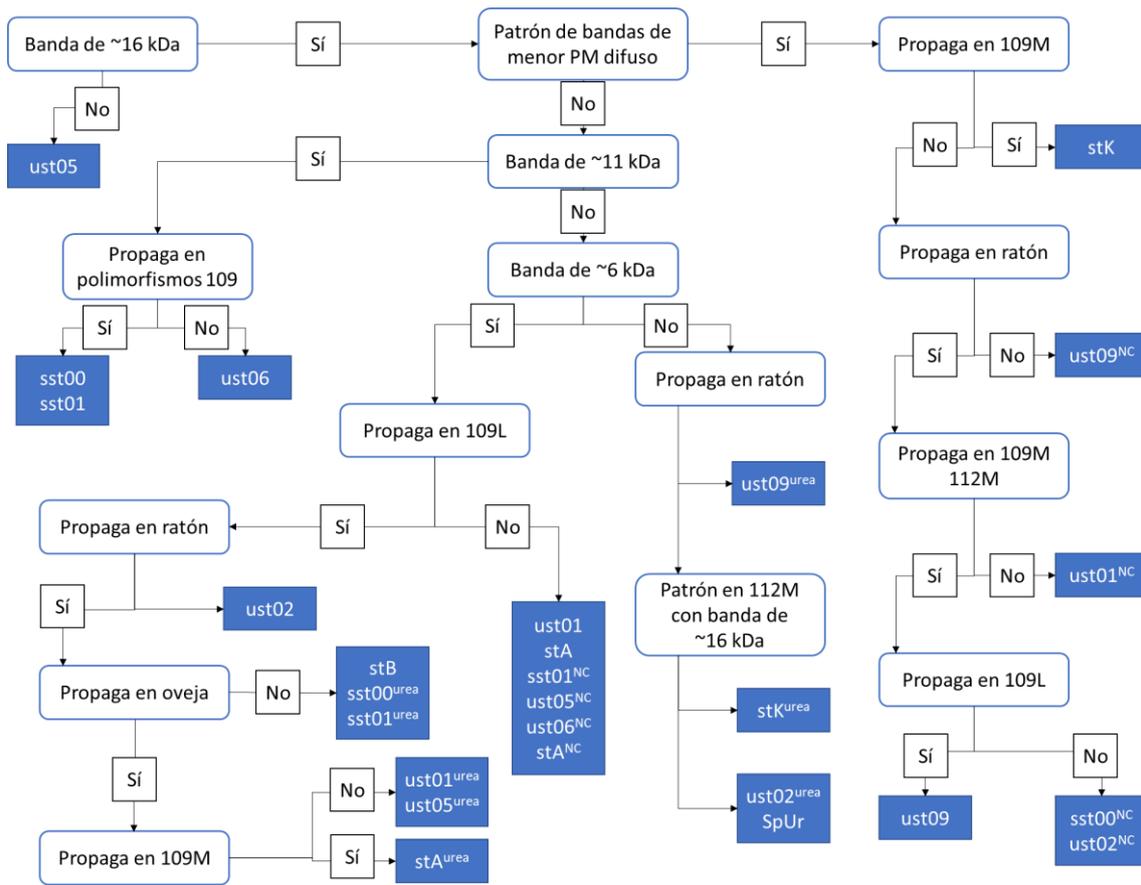


Figura 31. Árbol de decisión para la determinación rápida de las semillas originales, las semillas^{urea} y las semillas^{NC} basado en los datos de SMC obtenidos según su caracterización bioquímica.

DISCUSIÓN

El principal objetivo de esta tesis doctoral es descifrar los mecanismos moleculares subyacentes al fenómeno de cepa, así como la estabilidad de las mismas cuando el entorno de propagación se ve alterado. Estos pueden ser estudiados *in vitro* mediante el uso de proteínas recombinantes y PMSA. Estos cambios en la cepa se creen determinados por la estructura terciaria y cuaternaria que adquiere la proteína (173, 362). Los cambios conformacionales determinan las propiedades de cepa tales como la afectación de unas áreas encefálicas más que otras (tropismo) y, por consiguiente, las manifestaciones clínicas que caracterizan a la cepa en cuestión (55, 222, 223, 241). Sin embargo, se desconoce el papel que juegan ciertos factores en la estabilidad de las propiedades de cepa y de su estructura. Si bien hay muchos estudios que demuestran el papel fundamental que pueden jugar determinados cofactores polianiónicos, se desconoce en gran parte cómo se desarrolla la interacción entre estos y las proteínas para determinar o interferir en las propiedades de estas, así como la esencialidad de estos cofactores para mantener estas propiedades. Se sabe que el entorno químico de propagación es fundamental para el malplegamiento y se ha demostrado la interferencia de ciertos cationes divalentes como el cobre (363) en el malplegamiento proteico *in vitro*. Sin embargo, se desconoce hasta qué punto alteraciones en este entorno de propagación pueden alterar las propiedades de las cepas priónicas y si estos cambios son estables. En conjunto, comprender todos los fenómenos que afectan a la estabilidad y a la variabilidad de confórmeros supondría entender el fenómeno de cepa en mayor profundidad. Hasta ahora, la descripción y clasificación de cepas priónicas se ha basado en las manifestaciones clínicas (patología y bioquímica), debido a la dificultad para determinar sus diferencias conformacionales (173, 206). No obstante, la mayoría de los investigadores del área acepta que, en el marco de la teoría de “solo proteína”, una sola secuencia aminoacídica de PrP puede dar lugar a diferentes cepas priónicas y que estas se diferencian en su conformación tridimensional, que transmiten durante el proceso de propagación priónica (209, 210). Así pues, cambios o diferencias en las propiedades biológicas vendrían codificados por diferencias en la estructura tridimensional del prion.

El método de análisis bioquímico planteado en la presente tesis doctoral permitiría realizar estudios sistemáticos de cepas priónicas, analizando en profundidad sus propiedades bioquímicas y biológicas. Asimismo, abre la posibilidad de, en un futuro y con herramientas de biología estructural, poder correlacionar estructuras de confórmeros concretos con las características manifestadas. Para asegurar que las variaciones analizadas eran únicamente debidas a variaciones intrínsecas de cada confórmero, en el presente estudio se han unificado tanto la secuencia utilizada (todas las semillas presentan la misma secuencia aminoacídica de topillo rojo con la mutación 109I) como el entorno de propagación en el que se analizan (sustrato compuesto por tampón de conversión de dextrano

sulfatado). Si bien se ha considerado que los cofactores tienen un papel selector y que reducen el rango de cepas posibles (245), aquí se ha demostrado que se pueden obtener una diversidad de confórmers con propiedades biológicas y bioquímicas diferentes. Este hecho también ha sido demostrado por otros autores, donde con exactamente el mismo procedimiento (PMCA) y la misma composición de sustrato (complementado con ARN y lípidos) se obtuvieron priones recombinantes infecciosos (57) y no infecciosos (364), demostrando la estocasticidad intrínseca del proceso de malplegamiento espontáneo y la versatilidad del malplegamiento proteico capaz de otorgar propiedades distintas a los confórmers obtenidos.

De entre el conjunto de técnicas desarrolladas, la PMSA fue seleccionada debido a su demostrada capacidad para generar de manera rápida y eficiente el malplegamiento espontáneo de PrP recombinante, así como para propagar dicho malplegamiento manteniendo las características de los confórmers seleccionados (348, 361). De entre las diferentes PrP recombinantes disponibles en investigación en el campo de los priones, se seleccionó la PrP de topillo rojo con el polimorfismo 109I. Esta proteína ha demostrado ser muy susceptible al malplegamiento inducido por una gran variedad de priones aislados de animales y humanos afectados por distintas EET (356, 359, 365), hasta el punto de ser considerado un aceptor universal de priones (366). Además, el topillo rojo ha demostrado una gran versatilidad para mantener las propiedades de diferentes cepas priónicas una vez adaptadas al modelo (357), tanto el propio topillo rojo como ratones transgénicos, como el TgVole (1x), que expresan su proteína del prion (359, 366, 367). De entre las diferentes cepas de priones adaptadas a la PrP de topillo rojo destaca la CWD, ya que da lugar a la enfermedad priónica más rápida descrita hasta la fecha (25-28 dpi) (354) y por lo tanto es de especial interés para el estudio de las prionopatías.

Debido a esta particularidad, la cepa CWD adaptada a topillo rojo fue una de las que seleccionamos para el estudio de la diversidad de confórmers que pueden obtenerse con una determinada proteína (cepas sst00 y sst01, derivadas de CWD propagado a topillo rojo y posteriormente adaptadas a PMSA). Junto con esta, y basándonos en un estudio preliminar de su patrón electroforético, se obtuvieron un grupo de proteínas malplegadas espontáneamente en PMSA (ust01, ust02, ust05, ust06 y ust09). Ya que los priones existen como diferentes cepas en la naturaleza (es decir, que en un mismo hospedador exhiben fenotipos diferentes y transmisibles) (206), en el contexto de la hipótesis de solo proteína esta diversidad de cepas debe ser codificada por conformaciones diferentes de la PrP^{Sc} (368). Estas alteraciones en la estructura tridimensional pueden correlacionarse con cambios en la susceptibilidad a la digestión por proteasas, generando puntos de corte más o menos accesibles en función del conformero analizado. Es por ello por lo que se decidió usar el patrón electroforético diferente de las proteínas malplegadas como parámetro para la selección de las semillas obtenidas espontáneamente. El análisis de pequeñas diferencias basadas en cambios sutiles del patrón electroforético tras la digestión con proteasas ha sido bastante dificultoso hasta la fecha debido al uso de priones en homogeneizados de encéfalo, cuyas proteínas interferían en el análisis por tinción de proteína total, y a la dificultad para escalar los procesos de propagación de priones *in vitro*, ya que

DISCUSIÓN

los volúmenes con los que trabaja la PMCA son insuficientes para este tipo de análisis. Por todo ello ha sido fundamental el desarrollo de la PMSA que permite obtener grandes cantidades (resolviendo el problema de la escalabilidad) en sustratos con químicamente definidos (eliminando la interferencia de proteínas encefálicas), permitiendo la evaluación de los patrones de movilidad electroforética mediante tinción de proteína total y sin pérdida de información o restricciones debidas a la especificidad de los anticuerpos utilizados en *Western blot*.

Tal y como se esperaba de acuerdo con sus patrones de movilidad electroforética distinguibles, los confórmeros recombinantes seleccionados manifestaron características biológicas diferentes, con tiempos de incubación distintos. El estudio histopatológico detallado de los cerebros de los animales inoculados aún está inconcluso y por tanto, no permite establecer claras diferencias en cuanto al tropismo o la afectación diferente de los animales en función de la semilla inoculada, si bien se aprecia en todas ellas rasgos típicos de prionopatía, como es la espongirosis, y el signo patognomónico de las EET: la presencia de PrP^{Sc}, malplegada y resistente a proteasas, ya sea de manera difusa en el tejido o formando placas amiloides. El patrón electroforético de los cerebros revelaba un patrón clásico en todos los casos, a excepción de ust05, que presentaba patrón clásico y atípico. Si bien aún se requiere un estudio en mayor profundidad de las características biológicas de las semillas, los datos fueron suficientes como para aceptar que nos encontrábamos con confórmeros con propiedades diferentes.

La posibilidad de caracterizar estos confórmeros en laboratorio, sabiendo que tienen manifestaciones biológicas diferentes, es especialmente interesante, ya que en la actualidad para definir y asegurar que dos semillas son diferentes se requiere un análisis de sus manifestaciones clínicas e histopatológicas. No obstante, para estudiar la diversidad de confórmeros y determinar potenciales modificaciones en sus características debidas al entorno de propagación, se requiere de una metodología robusta y rápida que no implique inoculaciones *in vivo*, con los largos tiempos de incubación que conlleva. Por ello, para el análisis *in vitro* de las semillas decidimos hacer uso de un fenómeno natural que ocurre en la transmisión de priones: el fenómeno de barrera de transmisión (250). Esta barrera se pone de manifiesto cuando las secuencias aminoacídicas de donante (PrP^{Sc}, prion) y receptor (PrP^C) son diferentes (369), ya que la secuencia determina los posibles confórmeros que puede adquirir la proteína (4, 173, 300) y la eficiencia con la que este confórmero se replica (301). Si bien, en estudios de barrera *in vivo*, otros factores pueden alterar el efecto de cambios aminoacídicos, como la ruta de infección (370) o la posible existencia de cofactores aún desconocidos que podrían influir en la eficiencia de propagación de un determinado prion en una especie en particular (303). Sin embargo, en el estudio *in vitro*, haciendo uso de la PMSA que permite trabajar con proteínas recombinantes con secuencia aminoacídica conocida y cofactores controlados se puede evaluar el fenómeno de barrera de transmisión con facilidad como posible elemento diferenciador entre las semillas seleccionadas.

Para el estudio de esta barrera se utilizaron proteínas recombinantes de topillo rojo con alteraciones en las posiciones 109 y 112. Los polimorfismos seleccionados en la posición 109 de la PrP de topillo rojo se basan en el propio polimorfismo natural existente en poblaciones del animal silvestre (se pueden encontrar individuos tanto con isoleucina como con metionina en esta posición), los genotipos silvestres de ratón (que presentan leucina o alanina en esta misma posición) y la introducción de otros aminoácidos apolares (valina y fenilalanina) que no supongan una disrupción en la estructura, como puede ser el caso de la prolina. En el caso de la posición 112, es importante el cambio a metionina en lugar de la valina silvestre del topillo rojo porque permite estudiar el aminoácido presente en muchas otras especies en la posición señalada (como la humana o el ratón, ya que ambos presentan 112M). Junto con estos polimorfismos, también se analizó la capacidad de malplegar dos especies de interés: el ratón y la oveja. Ambos son animales estudiados extensamente en el campo de las enfermedades priónicas y que han servido para definir una variedad de cepas priónicas diferentes (371). La variedad de proteínas seleccionadas para la caracterización de las semillas recombinantes nos permitía así estudiar la capacidad diferencial para superar la barrera de transmisión polimórfica o interespecie en cada caso, revelando potenciales diferencias entre las semillas en base a sus capacidades de propagación en distintos sustratos. La barrera de transmisión ya ha sido empleada con anterioridad para determinar diferencias entre cepas o para caracterizar aislados diferentes. Las cepas *Hyper* (HY) y *Drowsy* (DY) (209, 222), originadas tras la adaptación de priones causantes de la prionopatía del visón (TME) al hámster, no solo se diferenciaban bioquímica y biológicamente en hámster (222, 224, 230, 235), sino en la capacidad diferencial para volver a infectar a visones, siendo una propiedad que solo la cepa DY posee, mientras que HY es incapaz de pasar la barrera de transmisión (212). Esta misma propiedad se ha visto con diferentes cepas priónicas procedentes de ciervo (CWD). Las cepas Wisc-1 y H95 aisladas de ciervos de cola blanca son claramente diferenciables cuando se transmiten en hámster: mientras que Wisc-1 infecta eficientemente, los hámsteres presentan resistencia a la inoculación con H95 con tasas de ataque incompletas (372).

En el análisis bioquímico realizado basado en la capacidad diferencial para propagar a expensas de proteínas con secuencias diferentes a la original y, por tanto, sobrepasando la barrera de transmisión, cabe destacar que sst00 y sst01 presentan exactamente las mismas características bioquímicas. Esto nos sirve para validar el método, ya que en realidad ambas semillas son la misma de acuerdo a sus características biológicas y así se ha tratado en el correspondiente apartado. Y, a la vez, son claramente diferentes del resto de semillas utilizadas. Es interesante también que son las únicas capaces de propagar a expensas de todas las proteínas recombinantes utilizadas como sustrato y que es una característica que no se ha observado en ninguna de las otras semillas. Esta peculiaridad puede deberse a que son las únicas semillas que proceden de procedimientos de propagación *in vitro* inoculados con CWD, un prion con una alta capacidad propagativa en topillo rojo, como ya se ha mencionado anteriormente.

DISCUSIÓN

La caracterización bioquímica también demuestra una mayor capacidad de discriminación que el simple análisis de patrones electroforéticos, ya que semillas con el mismo aspecto en SDS-PAGE, como es el caso de ust01 y ust02, presentan capacidad de malplegar diferentes proteínas recombinantes en laboratorio. Esto confirma que el método ofrece la posibilidad de caracterizar diferencias entre cepas con mayor resolución que la observación de patrones electroforéticos, acercándose al objetivo de suplir los bioensayos para la determinación de diferencias entre potenciales cepas.

Una mención especial requiere el caso de la semilla ust05, cuyo patrón electroforético cambia al ser propagada en algunos polimorfismos con variaciones en posición 109. La semilla ust05 es la única que carece de una banda de ~16 kDa observable y presenta también un aspecto en microscopía electrónica (agregados amorfos de los que sobresalen fibras) claramente diferente del resto (fibras claramente definidas). Además, es la única semilla que, pese a presentar una tasa de ataque completa, no da lugar a signos neurológicos claros. El análisis de la PrP^{Sc} encefálica recuperada mostraba patrones atípicos (~7 kDa) a excepción de un único animal con patrón clásico. El hecho de haberse detectado patrones electroforéticos diferentes en un mismo grupo de animales inoculados puede ser resultado de que la muestra original presenta una mezcla de confórmers. La presencia de variantes conformaciones dentro de una misma semilla o inóculo es algo que se ha estudiado anteriormente y del cual surgen dos posibles explicaciones: la muestra es una mezcla de semillas diferentes con propiedades biológicas y bioquímicas distintas o bien se pueden entender las cepas priónicas como un conjunto de variantes conformacionales a modo de cuasiespecies (173, 362).

Entender las cepas de priones como poblaciones de cuasiespecies supone entender que la heterogeneidad es un factor intrínseco al prion en sí mismo. Esta heterogeneidad radica en cambios conformacionales a nivel de la PrP^{Sc} y esta nube de confórmers similares entre sí (probablemente con uno de ellos como confórmero mayoritario) podrían encontrarse en equilibrio ya que las diferentes energías de activación para pasar de uno a otro serían bajas (362, 373). Cuando esta población de confórmers es transmitida en otro entorno, el perfil de energía libre necesaria puede variar, lo que permitiría que la población cambiara las proporciones de equilibrio cambiando el confórmero principal (305, 373).

Si aplicamos este concepto al análisis de ust05, podemos explicar la aparición de diferentes patrones electroforéticos como un cambio en las proporciones del equilibrio de una mezcla inicial, lo que provocaría que surgieran como predominantes confórmers que habían pasado desapercibidos previamente en la muestra. E igualmente podría ser el mecanismo molecular subyacente a la aparición de signos clínicos distintos en diferentes animales.

Por otro lado, no se puede descartar que el cambio de patrón electroforético se deba a la propia capacidad de malplegarse de cada proteína recombinante concreta, de forma que, si bien ust05 es capaz de inducir malplegamiento, este no resulte en la misma estructura que la original, originando una banda de ~16 kDa tras la digestión con PK. Así de hecho ha ocurrido en el análisis de la

transmisión de cepas priónicas a hospedadores diferentes del origen, donde se ha considerado a la nueva secuencia aminoacídica como la responsable del cambio en la cepa priónica (173, 301).

También puede analizarse el caso de la ust05 bajo el prisma de la hipótesis de *deformed templating*, propuesto a raíz de los análisis de fibras de PrP obtenidas con proteínas recombinantes de hámster (374). Estas fibras obtenidas por malplegamiento espontáneo carecían de capacidad infectiva al ser inoculada intracerebralmente, pero generaban en ratones inoculados la aparición de una PrP^{res} atípica que no presentaba ningún signo clínico asociado. En diversos pasajes en animales (utilizando homogeneizado de encéfalos de estos ratones inoculados inicialmente) se observa, sin embargo, la aparición de PrP^{Sc} infecciosa y que cursa con los signos clásicos de una prionopatía. El modelo de *deformed templating* propone que las fibras inoculadas pueden causar el malplegamiento de la PrP^C presente en el encéfalo generando una estructura no infecciosa (PrP^{res}), pero con la capacidad de generar estructuras infecciosas (PrP^{Sc}) induciendo un malplegamiento distinto o “deformado”. La cinética de propagación de PrP^{res} y PrP^{Sc} son distintas (siendo la segunda mucho más rápida), por lo que una vez generada la PrP^{Sc}, esta supera a la PrP^{res} en las inoculaciones seriadas. Esta hipótesis explicaría por qué a veces son necesarios varios pasajes para poder sobrepasar la barrera de transmisión *in vivo* pese a que no se pudiese detectar PrP^{Sc} clásica en el primer pase y, a su vez, sería la razón subyacente a que el producto final no sea igual al producto inoculado originalmente. Este mismo proceso podría ser la explicación a por qué ust05 genera estructuras diferentes a la propia al ser propagada en proteínas con las que existe una barrera de transmisión. La cinética acelerada de la PMSA evita la necesidad de diversos pasajes respecto a lo que ocurre *in vivo*, permitiendo que la semilla ust05 genere un malplegamiento inducido con estructura y características diferentes del propio y que se detectaría como un patrón con una banda de ~16 kDa en SDS-PAGE.

Puesto que diferentes entornos de propagación y diferentes orígenes pueden dar lugar a diferentes conformeros, se decidió incorporar otras tres semillas de origen diferente a las anteriores y analizarlas según los mismos parámetros y propiedades que habían sido analizados en las semillas originales. Estas tres semillas, stA, stB y stK tienen su origen en el malplegamiento espontáneo de proteínas recombinantes en entorno de homogeneizado de cerebro que, posteriormente, serían adaptadas a PMSA y a dextrano sulfatado, con la peculiaridad de stK fue previamente adaptada a PMSA y ARN. El ARN ha sido utilizado previamente como cofactor para la generación de priones recombinantes infecciosos (375, 376) por lo que las características que pueda adquirir una semilla adaptada a sustratos complementados con ARN como cofactor resultan interesantes para entender los mecanismos moleculares que subyacen a las características de cepa y la infectividad de las proteínas malplegadas.

Estas tres semillas presentaban la capacidad de generar fibras visibles a microscopía electrónica, al igual que las semillas anteriores, y la caracterización bioquímica también mostraba diferencias no solo entre ellas, sino también con las semillas previas, lo que nos permitió aumentar la diversidad de cepas de partida para experimentos posteriores.

DISCUSIÓN

El análisis matemático de la similitud de las diferentes semillas obtenidas revelaba ciertas características interesantes, como que las semillas stA y ust01 eran indistinguibles entre ellas por los métodos utilizados para la caracterización *in vitro*. Y que, a su vez, eran muy similares a la semilla stB y ust02, con la que compartían patrón electroforético similar caracterizado por la presencia de una banda de ~6 kDa (que se ha utilizado como carácter diferenciador dentro del análisis). Este análisis matemático tiene como objetivo poner de relieve similitudes entre las semillas que permitan clasificar de forma exhaustiva la variabilidad de conformeros que puede obtenerse con una sola secuencia de aminoácidos *in vitro*. Así, se pretende correlacionar estas diferencias con las características biológicas y de esta forma evaluar rápidamente el efecto de los cambios en el entorno de propagación sobre la variabilidad conformacional y sus consecuencias en las características biológicas de los priones resultantes. Puesto que se cree que las propiedades de cada cepa priónica están codificadas por su conformación tridimensional (222, 224, 225, 368, 373) y dado que estas cuatro semillas presentan un patrón electroforético parecido, es probable que tengan una estructura tridimensional similar que las dote de propiedades bioquímicas (y posiblemente biológicas) también similares.

Esto mismo ocurre con las semillas ust09 y stK, que presentan patrones electroforéticos similares (patrón difuso de bandas de menor tamaño) y según su análisis bioquímico solo difieren en la capacidad para propagar a expensas de la proteína recombinante 109M (presente en stK y ausente en ust09).

Poniendo en paralelo el análisis bioquímico y las propiedades biológicas que han mostrado las semillas inoculadas en TgVole (1x), no parece apreciarse una correlación entre rapidez para generar una enfermedad priónica y capacidad de malplegar el mayor número posible de PrP analizadas. De hecho, sst00 y sst01 son capaces de malplegar todas las proteínas utilizadas y, sin embargo, son la cepa con los tiempos de incubación más prolongados *in vivo* (con excepción de los ratones afectados de la variante atípica tras la inoculación con ust05). El tiempo que transcurre desde la inoculación hasta la aparición de los signos clínicos es característico de cada cepa, por lo que este tiempo de supervivencia mayor puede ser una característica intrínseca de esta cepa en concreto. Tampoco es la primera vez que se describen cepas priónicas con cinéticas lentas que son capaces de pasar más fácilmente la barrera de transmisión que semillas más rápidas. Es el caso de las cepas HY y DY derivadas del visón y adaptadas al hámster (209), donde la cepa HY es mucho más rápida que DY y, sin embargo, solo DY es capaz de volver a infectar a visones.

Sin embargo, la semilla cuyo patrón electroforético es más similar a sst00 y sst01 es la semilla ust06, cuyo análisis matemático en base a sus propiedades bioquímicas la sitúa como una semilla muy diferente (solo presenta un 36% de similitud) a las semillas derivadas de CWD, pese a que su cinética *in vivo* es también bastante lenta (210±7 dpi) en relación con otras semillas obtenidas espontáneamente en PMSA. Por ello el estudio únicamente del patrón electroforético no es suficiente para la diferenciación de cepas priónicas *in vitro* y el análisis bioquímico supone un complemento

para su estudio de gran utilidad, ya que el análisis del perfil electroforético solo nos permitirá identificar diferencias estructurales en la conformación tridimensional que afecten a puntos de corte de la PK, pero diferencias conformacionales que no alteren el acceso de la proteasa no son posibles de analizar. El método desarrollado, haciendo uso del fenómeno de barrera con diferentes proteínas recombinantes, es más discriminatorio que un estudio basado solo y únicamente en la digestión con proteasas y la tinción de proteína total tras una electroforesis. Complementado además con el análisis matemático, así como la posibilidad de realizar una caracterización exhaustiva *in vivo* de la infectividad y de las características histopatológicas de cada semilla, el método presentado permitiría empezar a definir las características bioquímicas concretas que correlacionan con características biológicas. Esto unido a la resolución de la estructura de los conformómeros generados y caracterizados, permitiría en un futuro determinar qué motivos estructurales son responsables o están implicados en las propiedades tanto bioquímicas como biológicas de cada cepa.

Teniendo en cuenta que las propiedades de la semilla están codificadas en su estructura y que modificaciones de esta configuración espacial deben llevar a la alteración de las propiedades biológicas o bioquímicas de las semillas, la posible modificación de las semillas se abordó desde dos frentes diferentes: el primero alterando la estabilidad de la proteína mediante el uso de agentes caotrópicos añadidos al sustrato de reacción durante la PMSA y el segundo eliminando el cofactor dextrano sulfatado del sustrato. El papel de los cofactores en la propagación priónica así como en la influencia en las propiedades del prion es un tema ampliamente estudiado en el área, si bien las conclusiones no son definitivas. Algunos autores entienden los cofactores como selectores o limitadores de la variabilidad estructural de las cepas priónicas; como es el caso de las cepas seleccionadas con diferentes cofactores a partir de una muestra inicial con homogeneizado de cerebro (245), o de cómo un conjunto de semillas diferentes propagadas en sustrato complementado con un único cofactor (fosfatidiletanolamina) convergían para dar lugar a una única cepa priónica (56). Sin embargo, otros autores defienden que los cofactores no alteran la estructura del prion, pero sí altera la infectividad de estos (377, 378). Por todo ello, consideramos nuestro sistema de gran utilidad para el estudio de este fenómeno.

La urea es un caotrópico ampliamente estudiado por ser un potente desestabilizador y desnaturalizante proteico utilizado ampliamente en experimentos *in vitro* (379). Debido a la mayor capacidad para generar puentes de hidrógeno entre urea y proteína que entre esta y el agua (380), las proteínas se encuentran parcial o totalmente desnaturalizadas en presencia de urea, adoptando estructuras más laxas (381, 382).

El uso de urea para la modificación de las semillas seleccionadas incorporaba un posible problema al análisis, debido a la inducción de malplegamiento espontáneo durante la PMSA. Tras analizar los patrones electroforéticos de PrP recombinante malplegadas espontáneamente en presencia de urea y de las muestras sembradas con las semillas recombinantes obtenidas previamente, solo los patrones electroforéticos obtenidos en sustratos complementados con urea 3 M eran claramente

DISCUSIÓN

distinguibles de las obtenidas en ausencia de semilla, por lo que solo se trabajó con las semillas obtenidas en dicho sustrato. Este efecto de los agentes caotrópicos para promover el malplegamiento es algo documentado previamente (55, 176), donde se han usado la urea y el guanidinio como complementos en procesos para la obtención de fibras amiloides de PrP recombinante. Sin embargo, los procesos de malplegamiento reportados son mucho más lentos (4 días) que los observados en PMSA (20 h) y las fibras obtenidas carecen de la característica resistencia a proteasas que presentan la mayoría de priones *bona fide*. También se ha empleado guanidinio como complemento en reacciones de RT-QuIC para facilitar el malplegamiento, si bien, las fibras amiloides que se generan con el tiempo en este tipo de sistemas carecen también de las propiedades que definen a los priones *bona fide*.

El efecto de los agentes caotrópicos en la estructura de la PrP (nativa o malplegada) parece alterar los estados de energía libre (ΔG) que permiten la transformación de PrP^C a PrP^{Sc} gracias a la formación de estados de plegamiento intermedios (383), lo que a su vez desestabilizaría la conformación nativa de la proteína facilitando su malplegamiento (ya sea de manera espontánea o inducido por semilla) (383). Sabiendo pues que el plegamiento de la PrP se ve alterado en presencia de agentes caotrópicos, se puede hipotetizar que la urea pueda generar estados ligeramente desplegados que den cabida a reestructuraciones tridimensionales durante la propagación, que al volver a propagar las semillas en sustratos sin urea pudieran dar lugar a estructuras diferentes de la original.

De las proteínas malplegadas obtenidas tras la propagación en urea, la más diferente de todas según su análisis matemático es ust09^{urea}, ya que presenta índices de similitud siempre inferiores a 0,7 (a excepción de su comparación con ust02, con quien comparte el 81% de las características analizadas).

También se recuperaron dos semillas indistinguibles de stB (sst00^{urea} y sst01^{urea}) y mientras que en las muestras originales y en la modificación llevada a cabo con la eliminación del cofactor se obtuvieron semillas con patrones difusos de bandas de pequeño tamaño (tipo ust09 o stK), en urea este patrón queda completamente descartado. Esto puede deberse a que las modificaciones sufridas durante la propagación en sustratos complementados con urea no son compatibles con ese tipo de estructura, por lo que tienden a reestructurarse tridimensionalmente en patrones más estables.

Junto la caracterización bioquímica de las semillas modificadas en urea, se incorporó una de las proteínas malplegadas de manera espontánea en sustrato complementado con urea 3 M. Esta semilla (SpUr) es indistinguible electroforéticamente y por las pruebas bioquímicas realizadas de la semilla ust02^{urea}. Esto puede suponer que realmente la semilla ust02 no pudo propagar en sustrato complementado con urea y que, por lo tanto, el resultado observado sea fruto de un malplegamiento espontáneo, obteniéndose la misma semilla que en el caso de los experimentos de urea 3 M sin semilla. Si bien no puede descartarse la posibilidad de que pudiese propagar correctamente y que las

modificaciones que haya sufrido por la urea en el entorno de propagación lo hayan llevado a un producto convergente a la semilla obtenida espontáneamente.

La convergencia de cepas observada en la urea puede entenderse bajo el enfoque de la hipótesis de “solo proteína” como alteraciones en la estructura tridimensional en las semillas originales que concurren hacia un patrón estructural común (o con diferencias que no han sido apreciadas por el método de caracterización bioquímica propuesto). La urea ya ha sido utilizada previamente para tratar de alterar intencionadamente las características de cepas priónicas (242). Para ello se generaron diferentes PrP malplegadas en presencia de concentraciones de urea variables que afectaban a la estabilidad conformacional del amiloide. Los amiloides eran formados y monitorizados mediante RT-QuIC. De los trece amiloides obtenidos en el experimento se seleccionaron tres con diferentes estabilidades conformacionales (cuya medida se basa en la concentración de guanidinio necesaria para que la mitad de la muestra se desnaturalice, $GdnHCl_{1/2}$). Las tres semillas seleccionadas presentaban propiedades biológicas diferentes al ser inoculadas en ratones: las cepas con mayor estabilidad conformacional tendían a presentar tiempos de incubación mayores que las cepas cuya estabilidad conformacional era menor. También cabe destacar que el análisis de todas las semillas (seleccionadas o no por el estudio de Colby y colaboradores) revela una gran convergencia en cuanto a la estabilidad conformacional (la mayoría de los amiloides estudiados tienen un $GdnHCl_{1/2} = 3.5$ M) cuando se utiliza la misma concentración de urea. Y, pese a que hay una correlación clara entre supervivencia y estabilidad conformacional, algunas de las semillas no seleccionadas presentan valores de estabilidad iguales que no correlacionan con los periodos de incubación observados *in vivo*, por lo que el análisis de la estabilidad conformacional es claramente insuficiente como criterio de análisis bioquímico para comprender las posibles propiedades de las semillas.

En cuanto al efecto directo de la urea en la PrP, se han analizado las variaciones conformacionales sufridas por la PrP^C en presencia de urea, sabiendo que genera poblaciones de intermediarios parcialmente estructurados (169, 384). Estos intermediarios se caracterizan por una mayor exposición de la cadena polipeptídica y un aumento de la hidrofobicidad (385). Además, la mayor estabilidad de estos intermediarios respecto a la de la proteína desplegada por completo aumenta las probabilidades de que estos intermediarios parcialmente plegados agreguen y adquieran una conformación priónica (PrP^{Sc}) (384, 386). Esto explica la facilidad con la que se obtiene malplegamiento espontáneo en presencia de urea en el sustrato de conversión. Por otro lado, las concentraciones crecientes de urea en el medio implican cambios estructurales distintos a nivel del extremo C-terminal, separando las hélices α_2 y α_3 de la PrP^C, a la vez que aumenta la proporción de proteína sin plegamiento (387). Estos cambios en la PrP nativa parecen ser decisivos para el malplegamiento posterior y podrían ser la razón subyacente a que los confórmeros obtenidos en presencia de 1 M y 2 M de urea sean diferentes a los obtenidos en 3 M, ya que a 3 M la estructura tridimensional de la que se parte está mucho más desnaturalizada y el rango de confórmeros malplegados que generaría en ausencia de molde (es decir, de manera espontánea y sin semilla que

DISCUSIÓN

guíe el malplegamiento) es menor, ya que las propiedades de los amiloides obtenidos en urea parece estar también muy influenciada por la concentración de urea en el entorno (242, 388).

Teniendo todo esto en cuenta podemos hipotetizar qué ocurre en las reacciones de PMSA complementadas con urea. En ausencia de urea en el medio, no se observa malplegamiento espontáneo ni bandas resistentes a la digestión con proteasas. A concentraciones bajas de urea (1-2 M), la estructura se vuelve más laxa, cambiando los motivos mostrados al medio y aumentando la hidrofobicidad de la proteína. Este aumento de la hidrofobicidad favorece la interacción entre proteínas respecto a la interacción con el solvente (380), pero la estructura aún mantiene plasticidad suficiente para adquirir una variedad de estructuras similar a la que se observa en sustratos sin urea. Sin embargo, a concentraciones superiores de urea en el entorno químico de propagación (3-5 M), el porcentaje de proteína desnaturalizada aumenta y estas zonas tienden a interactuar no entre ellas, sino que tienen preferencia por generar enlaces no covalentes con la urea (380). Debido a que las interacciones proteína-proteína se ven restringidas, esto podría dirigir el malplegamiento hacia una sola conformación espacial en ausencia de semilla, dando lugar al patrón característico formado por una sola banda de ~16 kDa que surge espontáneamente en todos los experimentos sin semilla con concentraciones de 3 M de urea o superior. Sin embargo, cuando se incorpora una semilla que guíe el malplegamiento sí se obtienen confórmeros con patrones electroforéticos diferentes y claramente diferenciables del patrón espontáneo. Esto puede deberse a que la estructura tridimensional de la PrP^{Sc} es más resistente que la de la PrP en su conformación nativa a la desnaturalización, aumentando la proporción de interacciones proteína-proteína a la vez que dirige el malplegamiento, lo que permite estructuras que, si bien están condicionadas por el entorno con urea (lo que lleva a la convergencia de cepas), sean diferentes a la estructura generada por malplegamiento espontáneo.

El otro proceso empleado para estudiar potenciales cambios conformacionales que derivasen en cambios en sus propiedades y también para tratar de modificar las proteínas malplegadas *in vitro* ha sido la propagación en entornos sin cofactor. Los cofactores parecen tener un papel crucial en la definición de las características bioquímicas de los priones, ya sea facilitando la obtención espontánea de priones recombinantes infecciosos (57, 332), como selectores o modificadores de confórmeros concretos a partir de una muestra inicial (56, 245) o como determinantes de la infectividad sin alterar la estructura tridimensional del prion (es decir, la misma estructura con el cofactor supone un prion infeccioso y sin el cofactor carece de capacidad infectiva) (377). En esta tesis se ha seleccionado el dextrano sulfatado como cofactor, que ya había sido empleado previamente para la selección de semillas provenientes de encéfalo (245). El dextrano sulfatado, sin embargo, también ha sido utilizado en diversas ocasiones por una posible capacidad inhibitoria de la propagación priónica, ya que la incubación de inóculos de *scrapie* con dextrano sulfatado previa a la inoculación ha dado lugar al aumento de la supervivencia de ratones (389, 390). En cultivos celulares, el dextrano sulfatado ha demostrado capacidad para inhibir la acumulación de PrP malplegada (391), posiblemente por activación de vías de endocitosis (392) que aumentarían la eliminación de la PrP

circulante. Por el contrario, en el caso de otras cepas priónicas, como es el caso de la BSE, el dextrano parece favorecer la propagación (393).

Para entender la interacción entre el cofactor y la PrP hay que entender la estructura del dextrano sulfatado, un polímero ramificado de glucosas con sustituciones de grupos sulfatos que, si bien no se encuentra de manera natural en el cuerpo, tiene estructuras similares a otros polisacáridos polianiónicos. Es el caso de los glucosaminoglicanos (GAG) cuya interacción directa con la PrP ha sido demostrada (394, 395), llegando a detectarse polisacáridos de glucosa de fibras priónicas purificadas de cerebros de hámster infectados con *scrapie* (396). Además, la interacción con GAG con la proteína afecta a la formación y acumulación de PrP^{Sc} tanto *in vitro* (391, 397, 398, 399) como *in vivo* (390, 400). La interacción entre GAG y PrP parece estar mediada por aminoácidos de la región 25-93 que incluye las octarrepeticiones (392, 401), y esta unión puede verse dificultada por la presencia de cationes divalentes (como el Cu²⁺) en el medio (363). Por ello, se cree que la interacción entre GAG y PrP debe ser mediada por cargas electrostáticas que se ven alteradas por la presencia de estos iones, ya que la región de octarrepeticiones es capaz de unirlos. Sin embargo, los GAG naturales presentan menor afinidad por la PrP que otros polisacáridos polianiónicos como el pentosano polisulfatado o el dextrano sulfatado (363). Además, para la unión, los grupos sulfatos de GAG como el heparán sulfato son esenciales (363), igual que ocurre con el dextrano no sulfatado, cuya unión a la PrP es de hasta 100 veces menos que el dextrano sulfatado (391), lo que indica el importante papel de las cargas negativas en la interacción.

Teniendo en cuenta que el dextrano sulfatado forma una especie de malla en solución y que los sulfatos son cargas negativas distribuidas por esta red polisacáridica, es posible que sirva de andamiaje para la formación de fibras de PrP^{Sc}. La PrP se uniría por la región N-terminal a los grupos sulfatados facilitando la interacción además entre diferentes monómeros de PrP o entre PrP^{Sc} y PrP^C por cercanía, con mayor probabilidad que encontrarse al azar en solución. Esto también puede explicar por qué el dextrano sulfatado selecciona una serie de semillas de una muestra original y no otras, ya que las fibras de proteínas malplegadas que sean capaces de ajustarse al patrón de cargas negativas presente en la red tendrán más proximidad con otras proteínas a malplegar y propagarán más eficientemente que otros confórmeros. De hecho, el patrón y el porcentaje de sulfatación en heparán sulfato han demostrado ser capaces de generar cepas priónicas diferentes con tropismos distintos (247).

Si eliminamos el dextrano sulfatado del entorno de propagación, se elimina la restricción de esta posible red, permitiendo la variación de la estructura tridimensional y pudiendo obtenerse confórmeros diferentes del original. En los estudios realizados en la presente tesis doctoral, todas las semillas presentan el mismo aspecto tras la adaptación a PMSA sin cofactor: carecen de banda de ~16 kDa y solo presentan una banda de ~9 kDa y otras de menor tamaño, resultando todas las semillas indistinguibles entre sí. Sin embargo, sí que se aprecian diferencias en el patrón electroforético al volver a propagarlas en entorno de dextrano sulfatado, obteniéndose dos patrones:

DISCUSIÓN

uno con patrón de bandas difuso y otro con bandas definidas de ~16 kDa, ~9 kDa y ~6 kDa. Esto puede explicarse de diferentes formas: i) en sustrato sin cofactor se originan cambios estructurales que solo son apreciables al volver a propagar en entorno de dextrano sulfatado; ii) en sustrato sin cofactor se generan una gran diversidad de confórmeros distintos no diferenciables entre sí por el patrón electroforético que, al propagar en entorno con dextrano sulfatado y debido a las restricciones causadas por el cofactor en el sustrato, convergen únicamente en dos patrones electroforéticos distintos; iii) en sustrato sin cofactor se genera una única variedad conformacional con un único patrón electroforético que es incompatible con las restricciones conformacionales impuestas por el dextrano sulfatado, por lo que se adapta al entorno con cofactor de dos maneras diferentes.

Las alteraciones sufridas por las semillas por la pérdida de cofactor y la posterior recuperación también pueden analizarse bajo la perspectiva del modelo de cambio conformacional. Este modelo concibe a la cepa priónica como una nube de confórmeros (cuasiespecies) (173, 362) que, si bien son similares entre sí, no son del todo iguales, siendo uno de ellos predominante, pero siendo imposible eliminar el resto de conformaciones de la muestra. Al propagar la semilla en entornos sin cofactor, las proporciones de confórmeros podrían verse alteradas, al igual que al volver al sustrato complementado con dextrano sulfatado, favoreciendo confórmeros cuya propagación sea más rápida en este tipo de entornos.

El análisis matemático de los confórmeros obtenidos tras la propagación en sustrato sin cofactor, revela un mayor número de similitudes en comparación con las semillas originales o con las de urea. Es decir, las semillas obtenidas por este método son mucho más similares entre sí (todas presentan un SMC mayor a 0,72), siendo cuatro de ellas indistinguibles entre sí por los métodos empleados para la caracterización bioquímica. Estas, a su vez, son también indistinguibles de ust01 y stA.

Si bien este tipo de modificaciones demuestra la esencialidad de los cofactores para el mantenimiento de las características de la semilla, sigue sin quedar claro el papel que juegan la interacción entre cofactor y proteína en el proceso de propagación priónica. Sin embargo, pese a que todas las proteínas son de nuevo propagadas en entornos con dextrano sulfatado para su caracterización, ninguna recupera las propiedades bioquímicas originales, sino que han sufrido una modificación que se mantiene incluso cuando el entorno químico varía, lo que contradice la teoría de algunos autores de que el cofactor solo altera la infectividad sin verse afectada la estructura tridimensional (377). Además, si bien los cofactores parecen restringir las propiedades de los priones, ya sea seleccionando confórmeros concretos de una mezcla inicial o modificando sus propiedades al ser utilizados en soluciones de propagación (245), permiten una variedad de confórmeros con propiedades biológicas diferentes (como los priones infecciosos y no infecciosos obtenidos de manera espontánea con ARN y lípidos como cofactores) (57, 364).

Para entender por completo el papel de los cofactores en la determinación de las propiedades de cepa, una vez resuelta la estructura tridimensional de la PrP^{Sc}, se podrá establecer qué grupos funcionales pueden interactuar y de qué manera con los diferentes cofactores. Igualmente, con la

estructura tridimensional de la PrP^{Sc}, se podrá explicar el efecto de la pérdida del cofactor en el entorno de propagación y por qué esto abriría la posibilidad de modificaciones estructurales capaces de ser propagadas y que afectarían a sus propiedades biológicas y bioquímicas, determinando las diferencias estructurales y conformacionales de cada cepa y qué regiones y de qué manera interactúan con los cofactores.

Analizando la diversidad obtenida en los diferentes experimentos, es apreciable que tanto las proteínas malplegadas obtenidas tras la modificación en urea como las obtenidas tras la propagación en entorno sin cofactores presentan una menor diversidad que las semillas originales (8 confórmeros diferenciables en la muestra original, frente a los 7 de urea y los 4 de no cofactor). Sin embargo, aunque la diversidad es menor, las semillas obtenidas tras las modificaciones son diferentes a las originales, por lo que la diversidad final aumenta de los 8 confórmeros obtenidos originalmente a 17 proteínas malplegadas diferentes según la caracterización bioquímica empleada. Además, las modificaciones causadas por la ausencia de cofactor y las causadas por la presencia de urea en el entorno de propagación son diferentes, ya que no hay semillas indistinguibles entre estos grupos y el análisis matemático comparativo entre ellas revela un SMC inferior a 0,72.

Las modificaciones sufridas por la ausencia de cofactor no parecen depender de la semilla de origen resultando en un posible proceso estocástico, ya que sst00 y sst01 que son originalmente iguales generan dos semillas (ss00^{NC} y sst01^{NC}) con propiedades bioquímicas diferentes y patrones electroforéticos distintos. Al igual que ocurre con stA y ust01: mientras que stA^{NC} permanece inmutable con respecto a la original, ust01^{NC} cambia por completo. El hecho de que la variabilidad de semillas obtenidas tras la propagación sin cofactor sea menor puede indicar que en ausencia de cofactores la variabilidad de confórmeros posibles se reduce. Esto explicaría también la uniformidad de patrones electroforéticos observados en sustrato sin cofactor, donde todas las semillas carecen de banda de ~16 kDa y solo presentan una banda de ~9 kDa y otras de menor tamaño. Estas estructuras adquiridas, como se ha comentado anteriormente, podrían no ser del todo compatibles con la presencia de dextrano sulfatado en el medio que, a modo de red de cargas negativas, forzaría pequeñas modificaciones cuando estas semillas volvieran a propagarse en presencia del cofactor, explicando las grandes similitudes observadas en el análisis matemático. Además, de las posibles estructuras que se adquieren tras la propagación en sustrato sin cofactores, predomina la que es igual a stA y a ust01. Esto podría deberse a que esta conformación sea la más estable y, por lo tanto, la más frecuente en el total de semillas obtenidas.

Para comprender en mayor profundidad todo este fenómeno, podría ponerse a punto un panel de pruebas bioquímicas similar al presentado, pero para semillas sin cofactor, pudiendo analizar las semillas en sustrato sin cofactor sin necesidad de volverlas a propagar en presencia de dextrano sulfatado. Si bien los datos obtenidos de este análisis de las propiedades bioquímicas no podrían compararse con el de las semillas originales (por encontrarse en entornos bioquímicos diferentes que podrían alterar los resultados), sí que nos permitiría conocer la variabilidad intrínseca de las

DISCUSIÓN

semillas^{NC} y saber si son todas indistinguibles entre sí igual que ocurre con el patrón electroforético o si tienen propiedades bioquímicas diferentes.

Por otro lado, las modificaciones causadas por la presencia de urea sí que parecen ir en consonancia con el tipo de semilla: sst00^{urea} y sst01^{urea} son indistinguibles entre sí, y ust01^{urea} y stA^{urea} son muy similares.

Según el análisis matemático, sin embargo, los cambios efectuados por la presencia de urea en el medio y los observados tras la pérdida de cofactor son claramente distintos. Es decir, ambos procesos llevan a cabo alteraciones de las estructuras tridimensionales de las semillas seleccionadas de manera diferente, generando nuevas variantes conformacionales con propiedades bioquímicas no solo distintas de las originales sino también diferentes entre ambos tipos de tratamientos. Son más parecidas, comparativamente, las semillas originales con las semillas^{urea} y las semillas originales con las semillas^{NC}, que las semillas^{urea} y semillas^{NC} entre sí. Esto puede deberse a que los mecanismos por los cuales interactúa el cofactor con la proteína y la urea con la proteína son distintos. Por un lado, el efecto caotrópico de la urea aumenta la hidrofobicidad y la pérdida de plegamiento (385), generando a su vez una disminución en las interacciones proteína-proteína (380). En ausencia de cofactor y de urea en el entorno químico de propagación, la proteína solo podría establecer enlaces no covalentes por interacciones con el solvente y, sobre todo, con otras proteínas. Por lo que si en presencia de urea se ven disminuidas las interacciones proteína-proteína y en experimentos sin cofactor estas interacciones no se ven afectadas o incluso se podrían ver favorecidas, es posible que las alteraciones sufridas por uno y otro método sean diferentes. Además, un aumento de la hidrofobicidad causado por la presencia de urea supone la exposición de grupos funcionales que no tienen que estar necesariamente expuestos en ausencia de cofactor, por lo que las interacciones entre proteínas también serían distintas en cada caso, lo que podría explicar las variaciones diferentes observadas con cada método de modificación planteado.

El confórmero más abundante es el tipo ust01, especialmente observado tras la modificación en entorno sin cofactor. Puede ser que este sea un confórmero especialmente estable en presencia de dextrano sulfatado y por ello aparezca en diversas ocasiones pese a los diferentes orígenes de las semillas que convergen en él. Por otro lado, los confórmeros con banda de ~11 kDa son los más escasos, observándose solo en la muestra original y no recuperándose nunca este patrón en ninguna de las modificaciones estudiadas. Al igual que ocurre con la semilla ust05, que carece de banda de ~16 kDa, característica que solo se ha obtenido en una ocasión en el conjunto de semillas originales.

Es posible que la variabilidad observada en cada caso fuera fruto de la estocasticidad intrínseca del método o de la naturaleza del prion en sí mismo. Para ello se podría hacer un análisis con un mayor número de semillas solo para analizar si estas proporciones se mantienen de manera estadísticamente significativa (lo que indicaría que efectivamente estos confórmeros están favorecidos/desfavorecidos y el proceso no es del todo estocástico) o, por el contrario, un aumento del número de réplicas podría demostrar la estocasticidad del proceso de malplegamiento

espontáneo. Sin embargo, teniendo en cuenta que la semilla ust05 es la única de su tipo en cuanto a patrón electroforético y que la presencia de banda de ~11 kDa solo es observada en las semillas derivadas de la adaptación de CWD a topillo rojo y PMSA y en la semilla espontánea ust06, es probable que, dentro de la estocasticidad, algunos confórmeros se vean favorecidos respecto a otros.

Un análisis de estabilidad conformacional podría arrojar luz sobre si las semillas observadas más frecuentemente (las que son tipo stA/ust01) son las más estables, aquellas cuya energía libre de formación es más baja y, por lo tanto, se encontrarían favorecidas. Este tipo de análisis también podrían explicar por qué las semillas sin banda de ~16 kDa son mayoritarias en sustrato sin cofactores, pero en presencia de dextrano sulfatado solo se encuentra la semilla ust05, siendo la única con esta característica ya sea antes o después de las modificaciones realizadas mediante urea o dextrano sulfatado.

No sabemos sin embargo si las modificaciones observadas tras las propagaciones en sustratos diferentes del original (ya sea con presencia de agente caotrópico o con ausencia del cofactor) son resultado de un proceso de adaptación o de selección. Si entendemos que las semillas, las cepas priónicas en sí mismas, están formadas por una nube de confórmeros (cuasiespecies) y que esta propiedad es intrínseca al prion en sí mismo, las alteraciones en el entorno de propagación solo permitirían variar las proporciones en las que estos confórmeros se encuentran en la muestra, lo que a su vez alteraría las propiedades bioquímicas finales. Sin embargo, si consideramos que cada cepa priónica presenta un solo confórmero y que este es el responsable de las propiedades biológicas y bioquímicas, los cambios en el entorno químico tendrían que alterar su estructura durante la propagación del prion *in vitro* de manera estable, de forma que adquiriera nuevas conformaciones que lo doten de propiedades bioquímicas diferentes de la original. Es posible, que ambos procesos ocurran de manera simultánea: las cepas pueden estar formadas por nubes de confórmeros muy similares entre sí cuyas proporciones sean alteradas (selección) al modificar el entorno químico de propagación y, a su vez, se vean forzadas a alterar su estructura (adaptación) para propagar correctamente. Si los priones presentan una sola estructura o si intrínsecamente están compuestos por una nube de confórmeros podrá estudiarse en más profundidad gracias a la reciente descripción de la estructura de un prion mamífero (149), que abre la puerta al análisis estructural de otras semillas para poder desentrañar a nivel estructural el fenómeno de cepas priónicas y los mecanismos moleculares que la rigen.

En cualquier caso, la diversidad de confórmeros obtenidos mediante PMSA, así como sus variantes modificadas, demuestran la plasticidad de una secuencia de PrP para generar diferentes variantes conformacionales con propiedades bioquímicas (y biológicas) diferentes. El hecho de poder obtener tal diversidad de cepas utilizando siempre los mismos parámetros es de especial relevancia, ya que hasta ahora hay pocos casos reportados respecto a la diversidad de cepas obtenidas sin que sean las condiciones experimentales las que traten de dirigir la variedad obtenida. Como ejemplo tenemos las dos cepas priónicas obtenidas con RNA y lípidos, siendo una infecciosa y la otra infecciosa (57, 364).

DISCUSIÓN

Aquí partimos de una diversidad de cepas mucho mayor, siendo la única variable incorporada la adición de semilla (para la obtención de sst00, sst01, stA, stB y stK) o el malplegamiento espontáneo (para las semillas ust01, ust02, ust05, ust06 y ust09). Especial relevancia tienen precisamente las semillas espontáneas generadas exactamente en las mismas condiciones experimentales en PMSA. Los confórmeros obtenidos eran claramente distintos tanto bioquímica como biológicamente, pese a que el entorno en el que se originaron era idéntico. Esto mismo es lo que ocurre en la naturaleza, donde surgen una diversidad de cepas sin que el entorno (encéfalo) ni la secuencia aminoacídica varíen y, puesto que la mayoría de las enfermedades priónicas son de origen espontáneo sin ninguna alteración genética (ya sea en el gen *PRNP* o en otros) asociada, el método planteado puede suponer una buena vía para el estudio de las prionopatías espontáneas. Debido a la versatilidad de la técnica, se podría estudiar el efecto de diferentes cofactores en la diversidad de cepas priónicas, así como su implicación en los determinantes moleculares de las mismas.

Además, la PMSA ha demostrado ser una herramienta útil para la generación no solo de proteínas malplegadas, sino también de modificaciones por variaciones en el entorno de propagación. De las posibles vías de modificación se han planteado la ausencia de cofactor y el empleo de agentes caotrópicos como primer abordaje al estudio de la estabilidad de las cepas ante cambios en el entorno químico durante la propagación priónica. Pero la PMSA podría permitir también no solo analizar la ausencia de cofactor sino el cambio de un cofactor por otro. Esto se ha estudiado parcialmente con la incorporación de la semilla stK que, pese a que tiene el mismo origen que la semilla stA, presentan propiedades bioquímicas totalmente diferentes y esto podría deberse a que stA es el resultado de la adaptación de una semilla directamente a sustrato con dextrano sulfatado mientras que stK fue previamente adaptada a sustratos complementados con ARN. Utilizando otros cofactores y analizando los cambios en las propiedades bioquímicas de las semillas se podría deducir qué cofactores tienen un mayor peso a la hora de modificar o definir las propiedades y los determinantes moleculares de cepa. El análisis estructural o la interacción proteína-cofactor mediante RMN ayudaría a entender qué partes están implicadas en la interacción y si el cofactor interactúa con la forma nativa de la PrP, con la malplegada o con ambas.

En definitiva, este trabajo abre la posibilidad de estudiar el efecto de los cofactores, así como de la diversidad de cepas priónicas de forma sistemática y rápida, lo que podría ayudar a discernir qué mecanismos moleculares subyacen a la determinación de las características moleculares que definen las diferentes cepas, así como del papel que juegan los cofactores en el proceso de malplegamiento y mantenimiento de estas características.

CONCLUSIONES

1. Se ha generado una variedad de proteínas recombinantes malplegadas *in vitro*, tanto a partir de una semilla encefálica como por procesos de malplegamiento espontáneo.
2. El análisis preliminar mediante bioensayo de estas semillas ha mostrado diferencias en cuanto a sus propiedades biológicas (tiempos de incubación y tipos de lesiones), revelándose como diferentes cepas.
3. El análisis bioquímico, basado en el patrón de movilidad electroforética y la capacidad de propagar a expensas de proteínas no homólogas, ha confirmado las diferencias observadas *in vivo*, permitiendo una distinción y caracterización rápida de las cepas *in vitro*.
4. El malplegamiento espontáneo en entornos de propagación diferentes ha dado lugar a nuevas semillas con características potencialmente distintas a las generadas previamente.
5. El análisis bioquímico previo ha servido para caracterizar las semillas obtenidas con diferentes entornos de propagación, permitiendo establecer una clasificación de todas las proteínas malplegadas obtenidas acorde a sus propiedades distintivas.
6. La alteración del entorno de propagación mediante la adición de un agente caotrópico ha causado modificaciones en las características bioquímicas de las semillas estudiadas, observándose una reducción de la diversidad detectada inicialmente.
7. La eliminación del cofactor del entorno de propagación también ha llevado a alteraciones en las características bioquímicas de las mismas semillas, dando lugar a una reducción de la diversidad aún mayor que la presencia del agente caotrópico.
8. Las semillas modificadas por la presencia del agente caotrópico muestran propiedades bioquímicas distintas respecto a las semillas alteradas tras la eliminación del cofactor, sugiriendo la existencia de diferentes mecanismos moleculares subyacentes a cada proceso de modificación.
9. El análisis bioquímico comparativo de las semillas originales y sus variantes modificadas ha revelado características comunes independientemente de los procesos de modificación a los que se han sometido, permitiendo la agrupación de semillas indistinguibles entre sí y acotando la diversidad observada.
10. El sistema de caracterización bioquímica desarrollado permite la clasificación de la diversidad de semillas existentes de acuerdo a las propiedades que muestran *in vitro*, que podrían correlacionarse con sus respectivas propiedades biológicas, permitiendo en el futuro la predicción de los fenotipos esperados para cada grupo de semillas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Weissmann C. The state of the prion. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2(11):861-71.
2. Ironside JW, Ritchie DL, Head MW. Prion diseases. *Handb Clin Neurol.* 2017;145:393-403.
3. Budka H, Aguzzi A, Brown P, Brucher JM, Bugiani O, Gullotta F, et al. Neuropathological diagnostic criteria for Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and other human spongiform encephalopathies (prion diseases). *Brain Pathol.* 1995;5(4):459-66.
4. Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science.* 1982;216(4542):136-44.
5. Pruden SJ, McAllister MM, Schultheiss PC, O'Toole D, Christensen DE. Abomasal emptying defect of sheep may be an acquired form of dysautonomia. *Vet Pathol.* 2004;41(2):164-9.
6. Zou WQ, Puoti G, Xiao X, Yuan J, Qing L, Cali I, et al. Variably protease-sensitive prionopathy: a new sporadic disease of the prion protein. *Ann Neurol.* 2010;68(2):162-72.
7. Minikel EV, Vallabh SM, Lek M, Estrada K, Samocha KE, Sathirapongsasuti JF, et al. Quantifying prion disease penetrance using large population control cohorts. *Sci Transl Med.* 2016;8(322).
8. Duffy P, Wolf J, Collins G, DeVoe AG, Streeten B, Cowen D. Letter: Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med.* 1974;290(12):692-3.
9. Bonda DJ, Manjila S, Mehndiratta P, Khan F, Miller BR, Onwuzulike K, et al. Human prion diseases: surgical lessons learned from iatrogenic prion transmission. *Neurosurg Focus.* 2016;41(1):E10.
10. Will RG, Ironside JW. Sporadic and Infectious Human Prion Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017;7(1).
11. Liberski PP, Sikorska B, Brown P. Kuru: the first prion disease. *Adv Exp Med Biol.* 2012;724:143-53.
12. Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, et al. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet.* 1996;347(9006):921-5.
13. van Duijn CM, Delasnerie-Laupretre N, Masullo C, Zerr I, de Silva R, Wientjens DP, et al. Case-control study of risk factors of Creutzfeldt-Jakob disease in Europe during 1993-95. European Union (EU) Collaborative Study Group of Creutzfeldt-Jakob disease (CJD). *Lancet.* 1998;351(9109):1081-5.
14. Brown P, Cathala F, Raubertas RF, Gajdusek DC, Castaigne P. The epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease: conclusion of a 15-year investigation in France and review of the world literature. *Neurology.* 1987;37(6):895-904.
15. Liberski PP. Historical overview of prion diseases: a view from afar. *Folia Neuropathol.* 2012;50(1):1-12.
16. M'Gowan JP. Investigation Into the Disease of Sheep Called "scrapie" (Traberkrankheit, La Tremblante) with Special Reference to Its Association with Sarcosporidiosis 1914.
17. Cuille J, Chelle P. La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable? *CR Acad Sci.* 1936;203:1552-4.
18. Morris JA, Gajdusek C. Encephalopathy in Mice Following Inoculation of Scrapie Sheep Brain. *Nature.* 1963;197:1084-6.

19. Creutzfeldt H. Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z Gesamte Neurol Psychiatr.* 1920;57:1-19.
20. Jakob A. Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischem Befunde. (Spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Z Gesamte Neurol Psychiatr.* 1921;64:147-228.
21. Gajdusek DC. Slow-virus infections of the nervous system. *N Engl J Med.* 1967;276(7):392-400.
22. Klatzo I, Gajdusek DC, Zigas V. Pathology of Kuru. *Lab Invest.* 1959;8(4):799-847.
23. Hadlow WJ. Kuru likened to scrapie: the story remembered. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2008;363(1510):3644.
24. Gajdusek DC, Gibbs CJ, Jr., Alpers M. Transmission and passage of experimental "kuru" to chimpanzees. *Science.* 1967;155(3759):212-4.
25. Gibbs CJ, Jr., Gajdusek DC. Experimental subacute spongiform virus encephalopathies in primates and other laboratory animals. *Science.* 1973;182(4107):67-8.
26. Lugaresi E, Medori R, Montagna P, Baruzzi A, Cortelli P, Lugaresi A, et al. Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N Engl J Med.* 1986;315(16):997-1003.
27. Medori R, Tritschler HJ, LeBlanc A, Villare F, Manetto V, Chen HY, et al. Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene. *N Engl J Med.* 1992;326(7):444-9.
28. Boellaard JW, Schlote W. 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, Straüssler, Scheinker) (author's transl). *Acta Neuropathol.* 1980;49(3):205-12.
29. Hsiao K, Baker HF, Crow TJ, Poulter M, Owen F, Terwilliger JD, et al. Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straüssler syndrome. *Nature.* 1989;338(6213):342-5.
30. Gajdusek DC, Gibbs CJ, Alpers M. Experimental transmission of a kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature.* 1966;209:794-6.
31. Gajdusek DC. Spongiform virus encephalopathies. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol).* 1972;6:78-83.
32. Zlotnik I, Grant DP. The occurrence of vacuolated neurons in the brains of hamsters affected with subacute sclerosing encephalitis following measles or Langkat virus infection. *Br J Exp Pathol.* 1975;56(1):72-6.
33. Pattison IH, Millson GC. Further experimental observations on scrapie. *J Comp Pathol.* 1961;71:350-9.
34. Latarjet R, Muel B, Haig DA, Clarke MC, Alper T. Inactivation of the scrapie agent by near monochromatic ultraviolet light. *Nature.* 1970;227(5265):1341-3.
35. Griffith JS. Self-replication and scrapie. *Nature.* 1967;215(5105):1043-4.
36. Merz PA, Somerville RA, Wisniewski HM, Iqbal K. Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta Neuropathol.* 1981;54(1):63-74.
37. Oesch B, Westaway D, Walchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, et al. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell.* 1985;40(4):735-46.
38. Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Walchli M, Groth DF, et al. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell.* 1986;46(3):417-28.

BIBLIOGRAFÍA

39. Borchelt DR, Scott M, Taraboulos A, Stahl N, Prusiner SB. Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J Cell Biol.* 1990;110(3):743-52.
40. Caughey B, Raymond GJ. The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J Biol Chem.* 1991;266(27):18217-23.
41. Stahl N, Baldwin MA, Teplow DB, Hood L, Gibson BW, Burlingame AL, et al. Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry.* 1993;32(8):1991-2002.
42. Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, et al. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(23):10962-6.
43. Pergami P, Jaffe H, Safar J. Semipreparative chromatographic method to purify the normal cellular isoform of the prion protein in nondenatured form. *Anal Biochem.* 1996;236(1):63-73.
44. Fraser H, Bruce M. Argyrophilic plaques in mice inoculated with scrapie from particular sources. *Lancet.* 1973;1(7803):617-8.
45. Benestad SL, Sarradin P, Thu B, Schonheit J, Tranulis MA, Bratberg B. Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet Rec.* 2003;153(7):202-8.
46. Gambetti P, Dong Z, Yuan J, Xiao X, Zheng M, Alsheklee A, et al. A novel human disease with abnormal prion protein sensitive to protease. *Ann Neurol.* 2008;63(6):697-708.
47. Nazor KE, Kuhn F, Seward T, Green M, Zwald D, Purro M, et al. Immunodetection of disease-associated mutant PrP, which accelerates disease in GSS transgenic mice. *EMBO J.* 2005;24(13):2472-80.
48. Torres JM, Castilla J, Pintado B, Gutierrez-Adan A, Andreoletti O, Aguilar-Calvo P, et al. Spontaneous generation of infectious prion disease in transgenic mice. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(12):1938-47.
49. Jackson WS, Borkowski AW, Watson NE, King OD, Faas H, Jasanoff A, et al. Profoundly different prion diseases in knock-in mice carrying single PrP codon substitutions associated with human diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(36):14759-64.
50. Watts JC, Giles K, Stohr J, Oehler A, Bhardwaj S, Grillo SK, et al. Spontaneous generation of rapidly transmissible prions in transgenic mice expressing wild-type bank vole prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(9):3498-503.
51. Castilla J, Saa P, Hetz C, Soto C. In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell.* 2005;121(2):195-206.
52. Castilla J, Morales R, Saa P, Barria M, Gambetti P, Soto C. Cell-free propagation of prion strains. *EMBO J.* 2008;27(19):2557-66.
53. Manuelidis L, Sklaviadis T, Akowitz A, Fritch W. Viral particles are required for infection in neurodegenerative Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(11):5124-8.
54. Legname G, Baskakov IV, Nguyen HO, Riesner D, Cohen FE, DeArmond SJ, et al. Synthetic mammalian prions. *Science.* 2004;305(5684):673-6.
55. Makarava N, Kovacs GG, Bocharova O, Savtchenko R, Alexeeva I, Budka H, et al. Recombinant prion protein induces a new transmissible prion disease in wild-type animals. *Acta Neuropathol.* 2010;119(2):177-87.

56. Deleault NR, Walsh DJ, Piro JR, Wang F, Wang X, Ma J, et al. Cofactor molecules maintain infectious conformation and restrict strain properties in purified prions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(28):E1938-46.
57. Wang F, Wang X, Yuan CG, Ma J. Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein. *Science*. 2010;327(5969):1132-5.
58. Watts JC, Drisaldi B, Ng V, Yang J, Strome B, Horne P, et al. The CNS glycoprotein Shadoo has PrP(C)-like protective properties and displays reduced levels in prion infections. *EMBO J*. 2007;26(17):4038-50.
59. Gabriel JM, Oesch B, Kretzschmar H, Scott M, Prusiner SB. Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(19):9097-101.
60. Strumbo B, Ronchi S, Bolis LC, Simonic T. Molecular cloning of the cDNA coding for *Xenopus laevis* prion protein. *FEBS Lett*. 2001;508(2):170-4.
61. Simonic T, Duga S, Strumbo B, Asselta R, Ceciliani F, Ronchi S. cDNA cloning of turtle prion protein. *FEBS Lett*. 2000;469(1):33-8.
62. Cotto E, Andre M, Forgue J, Fleury HJ, Babin PJ. Molecular characterization, phylogenetic relationships, and developmental expression patterns of prion genes in zebrafish (*Danio rerio*). *FEBS J*. 2005;272(2):500-13.
63. Sparkes RS, Simon M, Cohn VH, Fournier RE, Lem J, Klisak I, et al. Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(19):7358-62.
64. Aguzzi A, Calella AM. Prions: protein aggregation and infectious diseases. *Physiol Rev*. 2009;89(4):1105-52.
65. Westergard L, Christensen HM, Harris DA. The cellular prion protein (PrP(C)): its physiological function and role in disease. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1772(6):629-44.
66. Colby DW, Prusiner SB. Prions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(1):a006833.
67. Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K, Prusiner SB. Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell*. 1987;51(2):229-40.
68. Hedge RS, Mastrianni JA, Scott MR, DeFea KA, Tremblay P, Torchia M, et al. A Transmembrane Form of the Prion Protein in Neurodegenerative Disease. *Science*. 1998;279:827-34.
69. Hedge RS, Tremblay P, Groth D, DeArmond SJ, Prusiner SB, Lingappa VR. Transmissible and genetic prion diseases share a common pathway of neurodegeneration. *Nature*. 1999;402:822-6.
70. Lloyd SE, Mead S, Collinge J. Genetics of prion diseases. *Curr Opin Genet Dev*. 2013;23:345-51.
71. Riek R, Hornemann S, Wider G, Glockshuber R, Wuthrich K. NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett*. 1997;413(2):282-8.
72. Zahn R, Liu A, Luhrs T, Riek R, von Schroetter C, Lopez Garcia F, et al. NMR solution structure of the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(1):145-50.
73. Zahn R. The octapeptide repeats in mammalian prion protein constitute a pH-dependent folding and aggregation site. *J Mol Biol*. 2003;334(3):477-88.
74. Brown DR, Qin K, Herms JW, Madlung A, Manson J, Strome R, et al. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature*. 1997;390(6661):684-7.
75. Stockel J, Safar J, Wallace AC, Cohen FE, Prusiner SB. Prion protein selectively binds copper(II) ions. *Biochemistry*. 1998;37(20):7185-93.
76. Brown DR, Clive C, Haswell SJ. Antioxidant activity related to copper binding of native prion protein. *J Neurochem*. 2001;76(1):69-76.

BIBLIOGRAFÍA

77. Pushie MJ, Pickering IJ, Martin GR, Tsutsui S, Jirik FR, George GN. Prion protein expression level alters regional copper, iron and zinc content in the mouse brain. *Metallomics*. 2011;3(2):206-14.
78. Calzolari L, Lysek DA, Perez DR, Guntert P, Wuthrich K. Prion protein NMR structures of chickens, turtles, and frogs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(3):651-5.
79. Lysek DA, Schorn C, Nivon LG, Esteve-Moya V, Christen B, Calzolari L, et al. Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs, and sheep. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(3):640-5.
80. Zuegg J, Gready JE. Molecular dynamics simulation of human prion protein including both N-linked oligosaccharides and the GPI anchor. *Glycobiology*. 2000;10(10):959-74.
81. Katorcha E, Makarava N, Savtchenko R, D'Azzo A, Baskakov IV. Sialylation of prion protein controls the rate of prion amplification, the cross-species barrier, the ratio of PrP^{Sc} glycoform and prion infectivity. *PLoS Pathog*. 2014;10(9):e1004366.
82. Katorcha E, Daus ML, Gonzalez-Montalban N, Makarava N, Lasch P, Beekes M, et al. Reversible off and on switching of prion infectivity via removing and reinstalling prion sialylation. *Sci Rep*. 2016;6:33119.
83. Srivastava S, Katorcha E, Daus ML, Lasch P, Beekes M, Baskakov IV. Sialylation Controls Prion Fate in Vivo. *J Biol Chem*. 2017;292(6):2359-68.
84. Priola SA, Lawson VA. Glycosylation influences cross-species formation of protease-resistant prion protein. *EMBO J*. 2001;20(23):6692-9.
85. Tuzi NL, Cancellotti E, Baybutt H, Blackford L, Bradford B, Plinston C, et al. Host PrP glycosylation: a major factor determining the outcome of prion infection. *PLoS Biol*. 2008;6(4):e100.
86. Puig B, Altmeppen H, Glatzel M. The GPI-anchoring of PrP. *Prion*. 2014;8(1):11-8.
87. Marshall KE, Hughson A, Vascellari S, Priola SA, Sakudo A, Onodera T, et al. PrP Knockout Cells Expressing Transmembrane PrP Resist Prion Infection. *J Virol*. 2017;91(2).
88. Chesebro B, Race B, Meade-White K, Lacasse R, Race R, Klingeborn M, et al. Fatal transmissible amyloid encephalopathy: a new type of prion disease associated with lack of prion protein membrane anchoring. *PLoS Pathog*. 2010;6(3):e1000800.
89. Manson J, West JD, Thomson V, McBride P, Kaufman MH, Hope J. The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development*. 1992;115(1):117-22.
90. Tremblay P, Bouzamondo-Bernstein E, Heinrich C, Prusiner SB, DeArmond SJ. Developmental expression of PrP in the post-implantation embryo. *Brain Res*. 2007;1139:60-7.
91. Nuvolone M, Hermann M, Sorce S, Russo G, Tiberi C, Schwarz P, et al. Strictly co-isogenic C57BL/6J-Prnp(-/-) mice: A rigorous resource for prion science. *J Exp Med*. 2016;213:313-27.
92. Benvegnu S, Roncaglia P, Agostini F, Casalone C, Corona C, Gustincich S, et al. Developmental influence of the cellular prion protein on the gene expression profile in mouse hippocampus. *Physiol Genomics*. 2011;43(12):711-25.
93. Chadi S, Young R, Le Guillou S, Tilly G, Bitton F, Martin-Magniette ML, et al. Brain transcriptional stability upon prion protein-encoding gene invalidation in zygotic or adult mouse. *BMC Genomics*. 2010;11:448.
94. Bribian A, Fontana X, Llorens F, Gavin R, Reina M, Garcia-Verdugo JM, et al. Role of the cellular prion protein in oligodendrocyte precursor cell proliferation and differentiation in the developing and adult mouse CNS. *PLoS One*. 2012;7(4):e33872.

95. Steele AD, Emsley JG, Ozdinler PH, Lindquist S, Macklis JD. Prion protein (PrPc) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(9):3416-21.
96. Arantes C, Nomizo R, Lopes MH, Hajj GN, Lima FR, Martins VR. Prion protein and its ligand stress inducible protein 1 regulate astrocyte development. *Glia*. 2009;57(13):1439-49.
97. Prestori F, Rossi P, Bearzatto B, Laine J, Necchi D, Diwakar S, et al. Altered neuron excitability and synaptic plasticity in the cerebellar granular layer of juvenile prion protein knock-out mice with impaired motor control. *J Neurosci*. 2008;28(28):7091-103.
98. Santuccione A, Sytnyk V, Leshchyn'ska I, Schachner M. Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. *J Cell Biol*. 2005;169(2):341-54.
99. Sales N, Hassig R, Rodolfo K, Di Giamberardino L, Traiffort E, Ruat M, et al. Developmental expression of the cellular prion protein in elongating axons. *Eur J Neurosci*. 2002;15(7):1163-77.
100. Hajj GN, Lopes MH, Mercadante AF, Veiga SS, da Silveira RB, Santos TG, et al. Cellular prion protein interaction with vitronectin supports axonal growth and is compensated by integrins. *J Cell Sci*. 2007;120(Pt 11):1915-26.
101. Bendheim PE, Brown HR, Rudelli RD, Scala LJ, Goller NL, Wen GY, et al. Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. *Neurology*. 1992;42(1):149-56.
102. Herms J, Tings T, Gall S, Madlung A, Giese A, Siebert H, et al. Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J Neurosci*. 1999;19(20):8866-75.
103. Mironov A, Jr., Latawiec D, Wille H, Bouzamondo-Bernstein E, Legname G, Williamson RA, et al. Cytosolic prion protein in neurons. *J Neurosci*. 2003;23(18):7183-93.
104. Haeberle AM, Ribaut-Barassin C, Bombarde G, Mariani J, Hunsmann G, Grassi J, et al. Synaptic prion protein immuno-reactivity in the rodent cerebellum. *Microsc Res Tech*. 2000;50(1):66-75.
105. Jeffrey M, Halliday WG, Bell J, Johnston AR, MacLeod NK, Ingham C, et al. Synapse loss associated with abnormal PrP precedes neuronal degeneration in the scrapie-infected murine hippocampus. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2000;26(1):41-54.
106. Šišková Z, Reynolds RA, O'Connor V, Perry VH. Brain Region Specific Pre-Synaptic and Post-Synaptic Degeneration Are Early Components of Neuropathology in Prion Disease. *PLoS One*. 2013;8(1):e55004.
107. Bremer J, Baumann F, Tiberi C, Wessig C, Fischer H, Schwarz P, et al. Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance. *Nat Neurosci*. 2010;13(3):310-8.
108. Nishida N, Tremblay P, Sugimoto T, Shigematsu K, Shirabe S, Petromilli C, et al. A mouse prion protein transgene rescues mice deficient for the prion protein gene from purkinje cell degeneration and demyelination. *Lab Invest*. 1999;79(6):689-97.
109. Herms JW, Korte S, Gall S, Schneider I, Dunker S, Kretschmar HA. Altered intracellular calcium homeostasis in cerebellar granule cells of prion protein-deficient mice. *J Neurochem*. 2000;75(4):1487-92.
110. Tobler I, Gaus SE, Deboer T, Achermann P, Fischer M, Rulicke T, et al. Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature*. 1996;380(6575):639-42.
111. Huber R, Deboer T, Tobler I. Prion protein: a role in sleep regulation? *J Sleep Res*. 1999;8 Suppl 1:30-6.
112. Mercer RCC, Ma L, Watts JC, Strome R, Wohlgemuth S, Yang J, et al. The Prion Protein Modulates A-type K Currents Mediated by Kv4.2 Complexes through Dipeptidyl Aminopeptidase-like Protein 6. *J Biol Chem*. 2013;288(52):37241-55.

BIBLIOGRAFÍA

113. King B, Rizwan AP, Zamponi GW, Tumer RW. IKCa Channels Are a Critical Determinant of the Slow AHP in CA1 Pyramidal Neurons. *Cell Rep.* 2015;11:175-82.
114. Mallucci GR, Ratte S, Asante EA, Linehan J, Gowland I, Jefferys JG, et al. Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *EMBO J.* 2002;21(3):202-10.
115. Mayer ML. Structural biology of glutamate receptor ion channel complexes. *Curr Opin Struct Biol.* 2016;41:119-27.
116. Khosravani H, Zhang Y, Tsutsui S, Hameed S, Altier C, Hamid J, et al. Prion protein attenuates excitotoxicity by inhibiting NMDA receptors. *J Gen Physiol.* 2008;131(6):i5.
117. Black SA, Stys PK, Zamponi GW, Tsutsui S. Cellular prion protein and NMDA receptor modulation: protecting against excitotoxicity. *Frontiers in cell and developmental biology.* 2014;2:45.
118. Mitteregger G, Vosko M, Krebs B, Xiang W, Kohlmannspenger V, Nolting S, et al. The role of the octarepeat region in neuroprotective function of the cellular prion protein. *Brain Pathol.* 2007;17(2):174-83.
119. Guillot-Sestier MV, Sunyach C, Ferreira ST, Marzolo MP, Bauer C, Thevenet A, et al. alpha-Secretase-derived fragment of cellular prion, N1, protects against monomeric and oligomeric amyloid beta (A β)-associated cell death. *J Biol Chem.* 2012;287(7):5021-32.
120. Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J.* 2002;21(13):3317-26.
121. Lopes MH, Hajj GN, Muras AG, Mancini GL, Castro RM, Ribeiro KC, et al. Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. *J Neurosci.* 2005;25(49):11330-9.
122. Chen S, Yadav SP, Surewicz WK. Interaction between human prion protein and amyloid-beta (A β) oligomers: role OF N-terminal residues. *J Biol Chem.* 2010;285(34):26377-83.
123. Resenberger UK, Harmeier A, Woerner AC, Goodman JL, Muller V, Krishnan R, et al. The cellular prion protein mediates neurotoxic signalling of beta-sheet-rich conformers independent of prion replication. *EMBO J.* 2011;30(10):2057-70.
124. Fluharty BR, Biasini E, Stravalaci M, Sclip A, Diomede L, Balducci C, et al. An N-terminal Fragment of the Prion Protein Binds to Amyloid-beta Oligomers and Inhibits Their Neurotoxicity in Vivo. *J Biol Chem.* 2013;288(11):7857-66.
125. Brown DR, Schulz-Schaeffer WJ, Schmidt B, Kretzschmar HA. Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurol.* 1997;146(1):104-12.
126. Baldwin MA. Mass spectrometric analysis of prion proteins. *Adv Protein Chem.* 2001;57:29-54.
127. Hope J, Morton LJ, Farquhar CF, Multhaup G, Beyreuther K, Kimberlin RH. The major polypeptide of scrapie-associated fibrils (SAF) has the same size, charge distribution and N-terminal protein sequence as predicted for the normal brain protein (PrP). *EMBO J.* 1986;5(10):2591-7.
128. Hope J, Multhaup G, Reekie LJ, Kimberlin RH, Beyreuther K. Molecular pathology of scrapie-associated fibril protein (PrP) in mouse brain affected by the ME7 strain of scrapie. *Eur J Biochem.* 1988;172(2):271-7.
129. Prusiner SB, McKinley MP, Bowman KA, Bolton DC, Bendheim PE, Groth DF, et al. Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell.* 1983;35(2 Pt 1):349-58.
130. Diringier H, Gelderblom H, Hilmert H, Ozel M, Edelbluth C, Kimberlin RH. Scrapie infectivity, fibrils and low molecular weight protein. *Nature.* 1983;306(5942):476-8.

131. Wille H, Michelitsch MD, Guenebaut V, Supattapone S, Serban A, Cohen FE, et al. Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(6):3563-8.
132. Caughey B, Lansbury PT. Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci*. 2003;26:267-98.
133. Diaz-Espinoza R, Soto C. High-resolution structure of infectious prion protein: the final frontier. *Nat Struct Mol Biol*. 2012;19(4):370-7.
134. Caughey BW, Dong A, Bhat KS, Ernst D, Hayes SF, Caughey WS. Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry*. 1991;30(31):7672-80.
135. Safar J, Roller PP, Gajdusek DC, Gibbs CJ, Jr. Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein. *J Biol Chem*. 1993;268(27):20276-84.
136. Smirnovas V, Baron GS, Offerdahl DK, Raymond GJ, Caughey B, Surewicz WK. Structural organization of brain-derived mammalian prions examined by hydrogen-deuterium exchange. *Nat Struct Mol Biol*. 2011;18(4):504-6.
137. Cobb NJ, Sonnichsen FD, McHaourab H, Surewicz WK. Molecular architecture of human prion protein amyloid: a parallel, in-register beta-structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(48):18946-51.
138. Baron GS, Hughson AG, Raymond GJ, Offerdahl DK, Barton KA, Raymond LD, et al. Effect of glycans and the glycoposphatidylinositol anchor on strain dependent conformations of scrapie prion protein: improved purifications and infrared spectra. *Biochemistry*. 2011;50(21):4479-90.
139. Requena JR, Wille H. The structure of the infectious prion protein. *Prion*. 2014;8(1):60-6.
140. Sevillano AM, Fernandez-Borges N, Younas N, Wang F, S RE, Bravo S, et al. Recombinant PrP^{Sc} shares structural features with brain-derived PrP^{Sc}: Insights from limited proteolysis. *PLoS Pathog*. 2018;14(1):e1006797.
141. Peretz D, Williamson RA, Matsunaga Y, Serban H, Pinilla C, Bastidas RB, et al. A conformational transition at the N terminus of the prion protein features in formation of the scrapie isoform. *J Mol Biol*. 1997;273(3):614-22.
142. Wille H, Bian W, McDonald M, Kendall A, Colby DW, Bloch L, et al. Natural and synthetic prion structure from X-ray fiber diffraction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(40):16990-5.
143. Muller H, Brener O, Andreoletti O, Piechatek T, Willbold D, Legname G, et al. Progress towards structural understanding of infectious sheep PrP-amyloid. *Prion*. 2014;8(5):344-58.
144. McKinley MP, Braunfeld MB, Bellinger CG, Prusiner SB. Molecular characteristics of prion rods purified from scrapie-infected hamster brains. *J Infect Dis*. 1986;154(1):110-20.
145. Sim VL, Caughey B. Ultrastructures and strain comparison of under-glycosylated scrapie prion fibrils. *Neurobiol Aging*. 2009;30(12):2031-42.
146. Vazquez-Fernandez E, Vos MR, Afanasyev P, Cebey L, Sevillano AM, Vidal E, et al. The Structural Architecture of an Infectious Mammalian Prion Using Electron Cryomicroscopy. *PLoS Pathog*. 2016;12(9):e1005835.
147. Godsave SF, Wille H, Kujala P, Latawiec D, DeArmond SJ, Serban A, et al. Cryo-immunogold electron microscopy for prions: toward identification of a conversion site. *J Neurosci*. 2008;28(47):12489-99.
148. Godsave S, Wille H, Pierson J, Prusiner SB, Peters PJ. Plasma Membrane Invaginations Containing Clusters of Fulllength PrP^{Sc} are an Early Form of Prion-associated Neuropathology in vivo. *Neurobiol Aging*. 2013;34(6):1621-31.

BIBLIOGRAFÍA

149. Kraus A, Hoyt F, Schwartz CL, Hansen B, Hughson AG, Artikis E, et al. Structure of an infectious mammalian prion. *bioRxiv*. 2021:2021.02.14.431014.
150. Downing DT, Lazo ND. Molecular modelling indicates that the pathological conformations of prion proteins might be beta-helical. *Biochem J*. 1999;343 Pt 2:453-60.
151. Choi JH, Govaerts C, May BC, Cohen FE. Analysis of the sequence and structural features of the left-handed beta-helical fold. *Proteins*. 2008;73(1):150-60.
152. Nguyen JT, Inouye H, Baldwin MA, Fletterick RJ, Cohen FE, Prusiner SB, et al. X-ray diffraction of scrapie prion rods and PrP peptides. *J Mol Biol*. 1995;252(4):412-22.
153. Mizuno N, Baxa U, Steven AC. Structural dependence of HET-s amyloid fibril infectivity assessed by cryoelectron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(8):3252-7.
154. Silva CJ, Vazquez-Fernandez E, Onisko B, Requena JR. Proteinase K and the structure of PrP^{Sc}: The good, the bad and the ugly. *Virus Res*. 2015;207:120-6.
155. Groveman BR, Dolan MA, Taubner LM, Kraus A, Wickner RB, Caughey B. Parallel in-register intermolecular beta-sheet architectures for prion-seeded prion protein (PrP) amyloids. *J Biol Chem*. 2014;289(35):24129-42.
156. Theint T, Nadaud PS, Aucoin D, Helmus JJ, Pondaven SP, Surewicz K, et al. Species-dependent structural polymorphism of Y145Stop prion protein amyloid revealed by solid-state NMR spectroscopy. *Nat Commun*. 2017;8(1):753.
157. Wang L, Zhao K, Yuan H, Wang Q, Guan Z, Tao J, et al. Cryo-EM structure of an amyloid fibril formed by full-length human prion protein. *Nat Struct Mol Biol*. 2020;27(6):598-602.
158. Meier P, Genoud N, Prinz M, Maissen M, Rulicke T, Zurbriggen A, et al. Soluble dimeric prion protein binds PrP(Sc) in vivo and antagonizes prion disease. *Cell*. 2003;113(1):49-60.
159. Prusiner SB, Scott M, Foster D, Pan KM, Groth D, Mirenda C, et al. Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell*. 1990;63(4):673-86.
160. Borchelt DR, Taraboulos A, Prusiner SB. Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J Biol Chem*. 1992;267(23):16188-99.
161. Caughey B, Baron GS, Chesebro B, Jeffrey M. Getting a grip on prions: oligomers, amyloids, and pathological membrane interactions. *Annu Rev Biochem*. 2009;78:177-204.
162. Taraboulos A, Raeber AJ, Borchelt DR, Serban D, Prusiner SB. Synthesis and trafficking of prion proteins in cultured cells. *Mol Biol Cell*. 1992;3(8):851-63.
163. Gabizon R, McKinley MP, Prusiner SB. Purified prion proteins and scrapie infectivity copartition into liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(12):4017-21.
164. Silveira JR, Raymond GJ, Hughson AG, Race RE, Sim VL, Hayes SF, et al. The most infectious prion protein particles. *Nature*. 2005;437(7056):257-61.
165. Safar J. The folding intermediate concept of prion protein formation and conformational links to infectivity. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1996;207:69-76.
166. Cohen FE, Prusiner SB. Pathologic conformations of prion proteins. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:793-819.
167. Bradley R, Wilesmith JW. Epidemiology and control of bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Br Med Bull*. 1993;49(4):932-59.
168. Glatzel M, Aguzzi A. The shifting biology of prions. *Brain Res Brain Res Rev*. 2001;36(2-3):241-8.
169. Apetri AC, Surewicz K, Surewicz WK. The effect of disease-associated mutations on the folding pathway of human prion protein. *J Biol Chem*. 2004;279(17):18008-14.

170. Liemann S, Glockshuber R. Influence of amino acid substitutions related to inherited human prion diseases on the thermodynamic stability of the cellular prion protein. *Biochemistry*. 1999;38(11):3258-67.
171. Zhang Y, Swietnicki W, Zagorski MG, Surewicz WK, Sonnichsen FD. Solution structure of the E200K variant of human prion protein. Implications for the mechanism of pathogenesis in familial prion diseases. *J Biol Chem*. 2000;275(43):33650-4.
172. Cobb NJ, Surewicz WK. Prion diseases and their biochemical mechanisms. *Biochemistry*. 2009;48(12):2574-85.
173. Collinge J, Clarke AR. A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science*. 2007;318(5852):930-6.
174. Zukas AA, Bruederle CE, Carter JM. Sonication induced intermediate in prion protein conversion. *Protein Pept Lett*. 2008;15(2):206-11.
175. Masel J, Jansen VA. The measured level of prion infectivity varies in a predictable way according to the aggregation state of the infectious agent. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1535(2):164-73.
176. Makarava N, Kovacs GG, Savtchenko R, Alexeeva I, Budka H, Rohwer RG, et al. Genesis of mammalian prions: from non-infectious amyloid fibrils to a transmissible prion disease. *PLoS Pathog*. 2011;7(12):e1002419.
177. Sanchez de Groot N, Torrent M, Villar-Pique A, Lang B, Ventura S, Gsponer J, et al. Evolutionary selection for protein aggregation. *Biochem Soc Trans*. 2012;40(5):1032-7.
178. Kovacs GG, Budka H. Molecular pathology of human prion diseases. *Int J Mol Sci*. 2009;10(3):976-99.
179. Parchi P, Strammiello R, Giese A, Kretzschmar H. Phenotypic variability of sporadic human prion disease and its molecular basis: past, present, and future. *Acta Neuropathol*. 2011;121(1):91-112.
180. Brandner S, Isenmann S, Raeber A, Fischer M, Sailer A, Kobayashi Y, et al. Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature*. 1996;379(6563):339-43.
181. Büeler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, et al. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature*. 1992;356:577-82.
182. Mallucci GR, White MD, Farmer M, Dickinson A, Khatun H, Powell AD, et al. Targeting cellular prion protein reverses early cognitive deficits and neurophysiological dysfunction in prion-infected mice. *Neuron*. 2007;53(3):325-35.
183. Harris DA, True HL. New insights into prion structure and toxicity. *Neuron*. 2006;50(3):353-7.
184. Heiseke A, Aguib Y, Schatzl HM. Autophagy, prion infection and their mutual interactions. *Curr Issues Mol Biol*. 12(2):87-97.
185. Rubinsztein DC, DiFiglia M, Heintz N, Nixon RA, Qin ZH, Ravikumar B, et al. Autophagy and its possible roles in nervous system diseases, damage and repair. *Autophagy*. 2005;1(1):11-22.
186. Boellaard JW, Schlote W, Tateishi J. Neuronal autophagy in experimental Creutzfeldt-Jakob's disease. *Acta Neuropathol*. 1989;78(4):410-8.
187. Oh JM, Shin HY, Park SJ, Kim BH, Choi JK, Choi EK, et al. The involvement of cellular prion protein in the autophagy pathway in neuronal cells. *Mol Cell Neurosci*. 2008;39(2):238-47.
188. Zhou M, Ottenberg G, Sferrazza GF, Hubbs C, Fallani M, Rumbaugh G, et al. Neuronal death induced by misfolded prion protein is due to NAD⁺ depletion and can be relieved in vitro and in vivo by NAD⁺

BIBLIOGRAFÍA

replenishment. *Brain*. 2015;138:992-1008.

189. Cortes CJ, Qin K, Cook J, Solanki A, Mastrianni JA. Rapamycin delays disease onset and prevents PrP plaque deposition in a mouse model of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. *J Neurosci*. 2012;32(36):12396-405.
190. Giese A, Groschup MH, Hess B, Kretzschmar HA. Neuronal cell death in scrapie-infected mice is due to apoptosis. *Brain Pathol*. 1995;5(3):213-21.
191. Lucassen PJ, Williams A, Chung WC, Fraser H. Detection of apoptosis in murine scrapie. *Neurosci Lett*. 1995;198(3):185-8.
192. Jesionek-Kupnicka D, Buczynski J, Kordek R, Sobow T, Kloszewska I, Papierz W, et al. Programmed cell death (apoptosis) in Alzheimer's disease and Creutzfeldt-Jakob disease. *Folia Neuropathol*. 1997;35(4):233-5.
193. Pillot T, Drouet B, Pincon-Raymond M, Vandekerckhove J, Rosseneu M, Chambaz J. A nonfibrillar form of the fusogenic prion protein fragment 118-135 induces apoptotic cell death in rat cortical neurons. *J Neurochem*. 2000;75(6):2298-308.
194. O'Donovan CN, Tobin D, Cotter TG. Prion protein fragment PrP-(106-126) induces apoptosis via mitochondrial disruption in human neuronal SH-SY5Y cells. *J Biol Chem*. 2001;276(47):43516-23.
195. Lin DT, Jodoin J, Baril M, Goodyer CG, Leblanc AC. Cytosolic prion protein is the predominant anti-Bax prion protein form: exclusion of transmembrane and secreted prion protein forms in the anti-Bax function. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1783(10):2001-12.
196. Mansuy IM. Calcineurin in memory and bidirectional plasticity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;311:1195-208.
197. Hetz C, Russelakis-Carneiro M, Maundrell K, Castilla J, Soto C. Caspase-12 and endoplasmic reticulum stress mediate neurotoxicity of pathological prion protein. *EMBO J*. 2003;22(20):5435-45.
198. Soto C, Satani N. The intricate mechanisms of neurodegeneration in prion diseases. *Trends Mol Med*. 2011;17(1):14-24.
199. Walter P, Ron D. The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science*. 2011;334:1081-6.
200. Moreno JA, Radford H, Peretti D, Steinert JR, Verity N, Martin MG, et al. Sustained translational repression by eIF2alpha-P mediates prion neurodegeneration. *Nature*. 2012;485(7399):507-11.
201. Salter MW, Stevens B. Microglia emerge as central players in brain disease. *Nat Med*. 2017;23(9):1018-27.
202. Muzio L, Martino G, Furlan R. Multifaceted aspects of inflammation in multiple sclerosis: The role of microglia. *J Neuroimmunol*. 2007;191:39-44.
203. Williams A, Lucassen PJ, Ritchie D, Bruce M. PrP deposition, microglial activation, and neuronal apoptosis in murine scrapie. *Exp Neurol*. 1997;144(2):433-8.
204. Vincenti JE, Murphy L, Grabert K, McColl BW, Cancellotti E, Freeman TC, et al. Defining the Microglia Response during the Time Course of Chronic Neurodegeneration. *J Virol*. 2015;90(6):3003-17.
205. Carroll JA, Race B, Williams K, Striebel J, Chesebro B. Microglia Are Critical in Host Defense Against Prion Disease. *J Virol*. 2018.
206. Beringue V, Vilotte JL, Laude H. Prion agent diversity and species barrier. *Vet Res*. 2008;39(4):47.
207. Chesebro B. BSE and prions: uncertainties about the agent. *Science*. 1998;279(5347):42-3.

208. Soto C, Castilla J. The controversial protein-only hypothesis of prion propagation. *Nat Med.* 2004;10 Suppl:S63-7.
209. Bartz JC, Bessen RA, McKenzie D, Marsh RF, Aiken JM. Adaptation and selection of prion protein strain conformations following interspecies transmission of transmissible mink encephalopathy. *J Virol.* 2000;74(12):5542-7.
210. Peretz D, Scott MR, Groth D, Williamson RA, Burton DR, Cohen FE, et al. Strain-specified relative conformational stability of the scrapie prion protein. *Protein Sci.* 2001;10(4):854-63.
211. Bartz JC. Prion Strain Diversity. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(12).
212. Morales R, Abid K, Soto C. The prion strain phenomenon: molecular basis and unprecedented features. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1772(6):681-91.
213. Pattison IH, Millson GC. Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome. *J Comp Pathol.* 1961;71:101-9.
214. Morales R. Prion strains in mammals: Different conformations leading to disease. *PLoS Pathog.* 2017;13(7):e1006323.
215. Bruce ME. Scrapie strain variation and mutation. *Br Med Bull.* 1993;49(4):822-38.
216. Westaway D, Goodman PA, Mirenda CA, McKinley MP, Carlson GA, Prusiner SB. Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice. *Cell.* 1987;51(4):651-62.
217. Bruce ME, McBride PA, Farquhar CF. Precise targeting of the pathology of the sialoglycoprotein, PrP, and vacuolar degeneration in mouse scrapie. *Neurosci Lett.* 1989;102(1):1-6.
218. Bruce ME, Boyle A, Cousens S, McConnell I, Foster J, Goldmann W, et al. Strain characterization of natural sheep scrapie and comparison with BSE. *J Gen Virol.* 2002;83(Pt 3):695-704.
219. Lasmezas CI, Deslys JP, Demaimay R, Adjou KT, Hauw JJ, Dormont D. Strain specific and common pathogenic events in murine models of scrapie and bovine spongiform encephalopathy. *J Gen Virol.* 1996;77 (Pt 7):1601-9.
220. Fraser H, Dickinson AG. Scrapie in mice. Agent-strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation. *J Comp Pathol.* 1973;83(1):29-40.
221. Fraser H, Dickinson AG. The sequential development of the brain lesion of scrapie in three strains of mice. *J Comp Pathol.* 1968;78(3):301-11.
222. Bessen RA, Marsh RF. Identification of two biologically distinct strains of transmissible mink encephalopathy in hamsters. *J Gen Virol.* 1992;73 (Pt 2):329-34.
223. Mahal SP, Baker CA, Demczyk CA, Smith EW, Julius C, Weissmann C. Prion strain discrimination in cell culture: the cell panel assay. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(52):20908-13.
224. Bessen RA, Marsh RF. Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent. *J Virol.* 1992;66(4):2096-101.
225. Collinge J, Sidle KC, Meads J, Ironside J, Hill AF. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature.* 1996;383(6602):685-90.
226. Parchi P, Castellani R, Capellari S, Ghetti B, Young K, Chen SG, et al. Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol.* 1996;39(6):767-78.
227. Khalili-Shirazi A, Summers L, Linehan J, Mallinson G, Anstee D, Hawke S, et al. PrP glycoforms are associated in a strain-specific ratio in native PrP^{Sc}. *J Gen Virol.* 2005;86(Pt 9):2635-44.

BIBLIOGRAFÍA

228. Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H, Torchia M, et al. Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat Med*. 1998;4(10):1157-65.
229. Bellon A, Seyfert-Brandt W, Lang W, Baron H, Groner A, Vey M. Improved conformation-dependent immunoassay: suitability for human prion detection with enhanced sensitivity. *J Gen Virol*. 2003;84(Pt 7):1921-5.
230. Caughey B, Raymond GJ, Bessen RA. Strain-dependent differences in beta-sheet conformations of abnormal prion protein. *J Biol Chem*. 1998;273(48):32230-5.
231. Wadsworth JD, Hill AF, Joiner S, Jackson GS, Clarke AR, Collinge J. Strain-specific prion-protein conformation determined by metal ions. *Nat Cell Biol*. 1999;1(1):55-9.
232. Jones EM, Surewicz WK. Fibril conformation as the basis of species- and strain-dependent seeding specificity of mammalian prion amyloids. *Cell*. 2005;121(1):63-72.
233. Schoch G, Seeger H, Bogousslavsky J, Tolnay M, Janzer RC, Aguzzi A, et al. Analysis of prion strains by PrPSc profiling in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *PLoS Med*. 2006;3(2):e14.
234. Puoti G, Giaccone G, Rossi G, Canciani B, Bugiani O, Tagliavini F. Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: co-occurrence of different types of PrP(Sc) in the same brain. *Neurology*. 1999;53(9):2173-6.
235. Mulcahy ER, Bessen RA. Strain-specific kinetics of prion protein formation in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. 2004;279(3):1643-9.
236. Bessen RA, Marsh RF. Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J Virol*. 1994;68(12):7859-68.
237. Scialo C, De Cecco E, Manganotti P, Legname G. Prion and Prion-Like Protein Strains: Deciphering the Molecular Basis of Heterogeneity in Neurodegeneration. *Viruses*. 2019;11(3).
238. Dickinson AG, Fraser H, Outram GW. Scrapie incubation time can exceed natural lifespan. *Nature*. 1975;256(5520):732-3.
239. Kimberlin RH, Walker CA. Competition between strains of scrapie depends on the blocking agent being infectious. *Intervirology*. 1985;23(2):74-81.
240. Bartz JC, Aiken JM, Bessen RA. Delay in onset of prion disease for the HY strain of transmissible mink encephalopathy as a result of prior peripheral inoculation with the replication-deficient DY strain. *J Gen Virol*. 2004;85(Pt 1):265-73.
241. Burke CM, Walsh DJ, Mark KMK, Deleault NR, Nishina KA, Agrimi U, et al. Cofactor and glycosylation preferences for in vitro prion conversion are predominantly determined by strain conformation. *PLoS Pathog*. 2020;16(4):e1008495.
242. Colby DW, Wain R, Baskakov IV, Legname G, Palmer CG, Nguyen HO, et al. Protease-sensitive synthetic prions. *PLoS Pathog*. 2010;6(1):e1000736.
243. Deleault NR, Piro JR, Walsh DJ, Wang F, Ma J, Geoghegan JC, et al. Isolation of phosphatidylethanolamine as a solitary cofactor for prion formation in the absence of nucleic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(22):8546-51.
244. Miller MB, Wang DW, Wang F, Noble GP, Ma J, Woods VL, Jr., et al. Cofactor molecules induce structural transformation during infectious prion formation. *Structure*. 2013;21(11):2061-8.
245. Fernández-Borges N, Di Bari MA, Erana H, Sanchez-Martin M, Pirisinu L, Parra B, et al. Cofactors influence the biological properties of infectious recombinant prions. *Acta Neuropathol*. 2017.
246. Supattapone S. Synthesis of high titer infectious prions with cofactor molecules. *J Biol Chem*. 2014;289(29):19850-4.

247. Aguilar-Calvo P, Sevillano A, Bapat J, Soldau K, Sandoval DR, Altmeppen H, et al. Shortening heparan sulfate chains prolongs survival and reduces parenchymal plaques in prion disease caused by mobile, ADAM10-cleaved prions. *Acta Neuropathol.* 2019;139(3):527-46.
248. Snow AD, Wight TN, Nochlin D, Koike Y, Kimata K, DeArmond SJ, et al. Immunolocalization of heparan sulfate proteoglycans to the prion protein amyloid plaques of Gerstmann-Straussler syndrome, Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie. *Lab Invest.* 1990;63(5):601-11.
249. Sevillano AM, Aguilar-Calvo P, Kurt TD, Lawrence JA, Soldau K, Nam TH, et al. Prion protein glycans reduce intracerebral fibril formation and spongiosis in prion disease. *J Clin Invest.* 2020;130(3):1350-62.
250. Dickinson AG. Scrapie in sheep and goats. *Front Biol.* 1976;44:209-41.
251. Dickinson AG, Meikle VM. Host-genotype and agent effects in scrapie incubation: change in allelic interaction with different strains of agent. *Mol Gen Genet.* 1971;112(1):73-9.
252. Carp RI, Moretz RC, Natelli M, Dickinson AG. Genetic control of scrapie: incubation period and plaque formation in I mice. *J Gen Virol.* 1987;68 (Pt 2):401-7.
253. Lloyd SE, Thompson SR, Beck JA, Linehan JM, Wadsworth JD, Brandner S, et al. Identification and characterization of a novel mouse prion gene allele. *Mamm Genome.* 2004;15(5):383-9.
254. Bruce ME, McConnell I, Fraser H, Dickinson AG. 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.* 1991;72 (Pt 3):595-603.
255. Baylis M, Goldmann W. The genetics of scrapie in sheep and goats. *Curr Mol Med.* 2004;4(4):385-96.
256. Mowm T, Olsaker I, Hopp P, Moldal T, Valheim M, Benestad SL. Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases. *J Gen Virol.* 2005;86(Pt 1):231-5.
257. Saunders GC, Cawthraw S, Mountjoy SJ, Hope J, Windl O. PrP genotypes of atypical scrapie cases in Great Britain. *J Gen Virol.* 2006;87(Pt 11):3141-9.
258. Mazza M, Iulini B, Vaccari G, Acutis PL, Martucci F, Esposito E, et al. Co-existence of classical scrapie and Nor98 in a sheep from an Italian outbreak. *Res Vet Sci.* 88(3):478-85.
259. Tranulis MA, Osland A, Bratberg B, Ulvund MJ. Prion protein gene polymorphisms in sheep with natural scrapie and healthy controls in Norway. *J Gen Virol.* 1999;80 (Pt 4):1073-7.
260. Parchi P, Giese A, Capellari S, Brown P, Schulz-Schaeffer W, Windl O, et al. Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol.* 1999;46(2):224-33.
261. Hill AF, Joiner S, Wadsworth JD, Sidle KC, Bell JE, Budka H, et al. Molecular classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain.* 2003;126(Pt 6):1333-46.
262. Cali I, Castellani R, Yuan J, Al-Shekhlee A, Cohen ML, Xiao X, et al. Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease revisited. *Brain.* 2006;129(Pt 9):2266-77.
263. Head MW, Bunn TJ, Bishop MT, McLoughlin V, Lowrie S, McKimmie CS, et al. Prion protein heterogeneity in sporadic but not variant Creutzfeldt-Jakob disease: UK cases 1991-2002. *Ann Neurol.* 2004;55(6):851-9.
264. Notari S, Capellari S, Langeveld J, Giese A, Strammiello R, Gambetti P, et al. A refined method for molecular typing reveals that co-occurrence of PrP(Sc) types in Creutzfeldt-Jakob disease is not the rule. *Lab Invest.* 2007;87(11):1103-12.
265. Polymenidou M, Stoeck K, Glatzel M, Vey M, Bellon A, Aguzzi A. Coexistence of multiple PrPSc types in individuals with Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet Neurol.* 2005;4(12):805-14.

BIBLIOGRAFÍA

266. Wadsworth JD, Asante EA, Desbruslais M, Linehan JM, Joiner S, Gowland I, et al. Human prion protein with valine 129 prevents expression of variant CJD phenotype. *Science*. 2004;306(5702):1793-6.
267. Head MW. Human prion diseases: molecular, cellular and population biology. *Neuropathology*. 2013;33(3):221-36.
268. Benestad SL, Arsaç JN, Goldmann W, Noremark M. Atypical/Nor98 scrapie: properties of the agent, genetics, and epidemiology. *Vet Res*. 2008;39(4):19.
269. Arsaç JN, Andreoletti O, Bilheude JM, Lacroux C, Benestad SL, Baron T. Similar biochemical signatures and prion protein genotypes in atypical scrapie and Nor98 cases, France and Norway. *Emerg Infect Dis*. 2007;13(1):58-65.
270. Dagleish MP, Rodger SM, Simmons MM, Finlayson J, Buxton D, Chianini F. Atypical scrapie in a sheep in Scotland. *Vet Rec*. 2008;162(16):518-9.
271. De Bosschere H, Roels S, Dechamps P, Vanopdenbosch E. TSE detected in a Belgian ARR-homozygous sheep via active surveillance. *Vet J*. 2007;173(2):449-51.
272. Fediaevsky A, Tongue SC, Noremark M, Calavas D, Ru G, Hopp P. A descriptive study of the prevalence of atypical and classical scrapie in sheep in 20 European countries. *BMC Vet Res*. 2008;4:19.
273. Loiacono CM, Thomsen BV, Hall SM, Kiupel M, Sutton D, O'Rourke K, et al. Nor98 scrapie identified in the United States. *J Vet Diagn Invest*. 2009;21(4):454-63.
274. Mitchell GB, O'Rourke KI, Harrington NP, Soutyrine A, Simmons MM, Dudas S, et al. Identification of atypical scrapie in Canadian sheep. *J Vet Diagn Invest*. 2010;22(3):408-11.
275. Kittelberger R, Chaplin MJ, Simmons MM, Ramirez-Villaescusa A, McIntyre L, MacDiarmid SC, et al. Atypical scrapie/Nor98 in a sheep from New Zealand. *J Vet Diagn Invest*. 2010;22(6):863-75.
276. Cook RW, Bingham J, Besier AS, Bayley CL, Hawes M, Shearer PL, et al. Atypical scrapie in Australia. *Aust Vet J*. 2016;94(12):452-5.
277. Moore SJ, Simmons M, Chaplin M, Spiropoulos J. Neuroanatomical distribution of abnormal prion protein in naturally occurring atypical scrapie cases in Great Britain. *Acta Neuropathol*. 2008;116(5):547-59.
278. Klingeborn M, Wik L, Simonsson M, Renstrom LH, Ottinger T, Linne T. Characterization of proteinase K-resistant N- and C-terminally truncated PrP in Nor98 atypical scrapie. *J Gen Virol*. 2006;87(Pt 6):1751-60.
279. Gretzschel A, Buschmann A, Langeveld J, Groschup MH. Immunological characterization of abnormal prion protein from atypical scrapie cases in sheep using a panel of monoclonal antibodies. *J Gen Virol*. 2006;87(Pt 12):3715-22.
280. Luhken G, Buschmann A, Brandt H, Eiden M, Groschup MH, Erhardt G. Epidemiological and genetical differences between classical and atypical scrapie cases. *Vet Res*. 2007;38(1):65-80.
281. Fediaevsky A, Calavas D, Gasqui P, Moazami-Goudarzi K, Laurent P, Arsaç JN, et al. Quantitative estimation of genetic risk for atypical scrapie in French sheep and potential consequences of the current breeding programme for resistance to scrapie on the risk of atypical scrapie. *Genet Sel Evol*. 2010;42:14.
282. Baiardi S, Capellari S, Bartoletti Stella A, Parchi P. Unusual Clinical Presentations Challenging the Early Clinical Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob Disease. *J Alzheimers Dis*. 2018;64(4):1051-65.
283. Parchi P, Chen SG, Brown P, Zou W, Capellari S, Budka H, et al. Different patterns of truncated prion protein fragments correlate with distinct phenotypes in P102L Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(14):8322-7.

284. Piccardo P, Dlouhy SR, Lievens PM, Young K, Bird TD, Nochlin D, et al. Phenotypic variability of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease is associated with prion protein heterogeneity. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1998;57(10):979-88.
285. Piccardo P, Liepnieks JJ, William A, Dlouhy SR, Farlow MR, Young K, et al. Prion proteins with different conformations accumulate in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease caused by A117V and F198S mutations. *Am J Pathol.* 2001;158(6):2201-7.
286. Tagliavini F, Lievens PM, Tranchant C, Warter JM, Mohr M, Giaccone G, et al. 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.* 2001;276(8):6009-15.
287. Pirisinu L, Nonno R, Esposito E, Benestad SL, Gambetti P, Agrimi U, et al. Small ruminant nor98 prions share biochemical features with human gerstmann-straussler-scheinker disease and variably protease-sensitive prionopathy. *PLoS One.* 2013;8(6):e66405.
288. Weissmann C, Aguzzi A. Bovine spongiform encephalopathy and early onset variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Curr Opin Neurobiol.* 1997;7(5):695-700.
289. Kimberlin RH, Walker CA. Evidence that the transmission of one source of scrapie agent to hamsters involves separation of agent strains from a mixture. *J Gen Virol.* 1978;39(3):487-96.
290. Marsh RF, Burger D, Eckroade R, Zu Rhein GM, Hanson RP. A preliminary report on the experimental host range of the transmissible mink encephalopathy agent. *J Infect Dis.* 1969;120(6):713-9.
291. Zlotnik I, Rennie JC. Experimental Transmission of Mouse Passaged Scrapie to Goats, Sheep, Rats and Hamsters. *J Comp Pathol.* 1965;75:147-57.
292. Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConell I, Drummond D, Suttie A, et al. Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature.* 1997;389.
293. Hill AF, Collinge J. Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species. *APMIS.* 2002;110(1):44-53.
294. Race R, Chesebro B. Scrapie infectivity found in resistant species. *Nature.* 1998;392(6678):770.
295. Kimberlin RH, Walker CA, Fraser H. The genomic identity of different strains of mouse scrapie is expressed in hamsters and preserved on reisolation in mice. *J Gen Virol.* 1989;70 (Pt 8):2017-25.
296. Windl O, Buchholz M, Neubauer A, Schulz-Schaeffer W, Groschup M, Walter S, et al. Breaking an absolute species barrier: transgenic mice expressing the mink PrP gene are susceptible to transmissible mink encephalopathy. *J Virol.* 2005;79(23):14971-5.
297. Vanik DL, Surewicz KA, Surewicz WK. Molecular basis of barriers for interspecies transmissibility of mammalian prions. *Mol Cell.* 2004;14(1):139-45.
298. Carlson GA, Goodman PA, Lovett M, Taylor BA, Marshall ST, Peterson-Torchia M, et al. Genetics and polymorphism of the mouse prion gene complex: control of scrapie incubation time. *Mol Cell Biol.* 1988;8(12):5528-40.
299. Laude H, Vilette D, Le Dur A, Archer F, Soulier S. New in vivo and ex vivo models for the experimental study of sheep scrapie: development and perspectives. *Comptes Rendus Biologies.* 2002;325(1):49-57.
300. Chien P, Weissman JS, DePace AH. Emerging principles of conformation-based prion inheritance. *Annu Rev Biochem.* 2004;73:617-56.
301. Angers RC, Kang HE, Napier D, Browning S, Seward T, Mathiason C, et al. Prion strain mutation determined by prion protein conformational compatibility and primary structure. *Science.* 2010;328(5982):1154-8.

BIBLIOGRAFÍA

302. Pattison IH, Jones KM. Modification of a strain of mouse-adapted scrapie by passage through rats. *Res Vet Sci.* 1968;9(5):408-10.
303. Deleault NR, Kascsak R, Geoghegan JC, Supattapone S. Species-dependent differences in cofactor utilization for formation of the protease-resistant prion protein in vitro. *Biochemistry.* 2010;49(18):3928-34.
304. Li J, Browning S, Mahal SP, Oelschlegel AM, Weissmann C. Darwinian evolution of prions in cell culture. *Science.* 327(5967):869-72.
305. Mahal SP, Browning S, Li J, Suponitsky-Kroyter I, Weissmann C. Transfer of a prion strain to different hosts leads to emergence of strain variants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(52):22653-8.
306. Makarava N, Savtchenko R, Baskakov IV. Selective amplification of classical and atypical prions using modified protein misfolding cyclic amplification. *J Biol Chem.* 2013;288(1):33-41.
307. Domingo E, Sabo D, Taniguchi T, Weissmann C. Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population. *Cell.* 1978;13(4):735-44.
308. Domingo E. Viruses at the edge of adaptation. *Virology.* 2000;270(2):251-3.
309. Kimberlin RH, Walker CA. Pathogenesis of scrapie (strain 263K) in hamsters infected intracerebrally, intraperitoneally or intraocularly. *J Gen Virol.* 1986;67 (Pt 2):255-63.
310. Bruce ME, Dickinson AG. Biological evidence that scrapie agent has an independent genome. *J Gen Virol.* 1987;68 (Pt 1):79-89.
311. Krauss S, Vorberg I. Prions Ex Vivo: What Cell Culture Models Tell Us about Infectious Proteins. *Int J Cell Biol.* 2013;2013:704546.
312. Beranger F, Mange A, Solassol J, Lehmann S. Cell culture models of transmissible spongiform encephalopathies. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;289(2):311-6.
313. Kocisko DA, Come JH, Priola SA, Chesebro B, Raymond GJ, Lansbury PT, et al. Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature.* 1994;370(6489):471-4.
314. Raymond GJ, Bossers A, Raymond LD, O'Rourke KI, McHolland LE, Bryant PK, 3rd, et al. Evidence of a molecular barrier limiting susceptibility of humans, cattle and sheep to chronic wasting disease. *EMBO J.* 2000;19(17):4425-30.
315. Saborio GP, Permanne B, Soto C. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature.* 2001;411(6839):810-3.
316. Saa P, Castilla J, Soto C. Cyclic amplification of protein misfolding and aggregation. *Methods Mol Biol.* 2005;299:53-65.
317. Castilla J, Saa P, Morales R, Abid K, Maundrell K, Soto C. Protein misfolding cyclic amplification for diagnosis and prion propagation studies. *Methods Enzymol.* 2006;412:3-21.
318. Saa P, Castilla J, Soto C. Ultra-efficient replication of infectious prions by automated protein misfolding cyclic amplification. *J Biol Chem.* 2006;281(46):35245-52.
319. Soto C, Saborio GP, Anderes L. Cyclic amplification of protein misfolding: application to prion-related disorders and beyond. *Trends Neurosci.* 2002;25(8):390-4.
320. Yokoyama T, Takeuchi A, Yamamoto M, Kitamoto T, Ironside JW, Morita M. Heparin enhances the cell-protein misfolding cyclic amplification efficiency of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett.* 2011;498(2):119-23.
321. Green AJE, Zanusso G. Prion protein amplification techniques. *Handb Clin Neurol.* 2018;153:357-70.

322. Rubenstein R, Chang B. Re-assessment of PrP(Sc) distribution in sporadic and variant CJD. *PLoS One*. 2013;8(7):e66352.
323. Bougard D, Brandel JP, Bélondrade M, Béringue V, Segarra C, Fleury H, et al. Detection of prions in the plasma of presymptomatic and symptomatic patients with variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Sci Transl Med*. 2016;8(370):370ra182.
324. Moda F, Gambetti P, Notari S, Concha-Marambio L, Catania M, Park KW, et al. Prions in the urine of patients with variant Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med*. 2014;371(6):530-9.
325. Bougard D, Belondrade M, Mayran C, Bruyere-Ostells L, Lehmann S, Fournier-Wirth C, et al. Diagnosis of Methionine/Valine Variant Creutzfeldt-Jakob Disease by Protein Misfolding Cyclic Amplification. *Emerg Infect Dis*. 2018;24(7):1364-6.
326. Castilla J, Saa P, Soto C. Detection of prions in blood. *Nat Med*. 2005;11(9):982-5.
327. Castilla J, Gonzalez-Romero D, Saa P, Morales R, De Castro J, Soto C. Crossing the species barrier by PrP(Sc) replication in vitro generates unique infectious prions. *Cell*. 2008;134(5):757-68.
328. Jones M, Peden AH, Prowse CV, Groner A, Manson JC, Turner ML, et al. In vitro amplification and detection of variant Creutzfeldt-Jakob disease PrPSc. *J Pathol*. 2007;213(1):21-6.
329. Atarashi R, Moore RA, Sim VL, Hughson AG, Dorward DW, Onwubiko HA, et al. Ultrasensitive detection of scrapie prion protein using seeded conversion of recombinant prion protein. *Nat Methods*. 2007;4(8):645-50.
330. Kim JI, Cali I, Surewicz K, Kong Q, Raymond GJ, Atarashi R, et al. Mammalian prions generated from bacterially expressed prion protein in the absence of any mammalian cofactors. *J Biol Chem*. 2010;285(19):14083-7.
331. Fernandez-Borges N, Chianini F, Erana H, Vidal E, Eaton SL, Pintado B, et al. Naturally prion resistant mammals: a utopia? *Prion*. 2012;6(5):425-9.
332. Wang F, Wang X, Ma J. Conversion of bacterially expressed recombinant prion protein. *Methods*. 2011;53(3):208-13.
333. Atarashi R, Wilham JM, Christensen L, Hughson AG, Moore RA, Johnson LM, et al. Simplified ultrasensitive prion detection by recombinant PrP conversion with shaking. *Nat Methods*. 2008;5(3):211-2.
334. Wilham JM, Orru CD, Bessen RA, Atarashi R, Sano K, Race B, et al. Rapid end-point quantitation of prion seeding activity with sensitivity comparable to bioassays. *PLoS Pathog*. 2010;6(12):e1001217.
335. Xue C, Lin TY, Chang D, Guo Z. Thioflavin T as an amyloid dye: fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation. *R Soc Open Sci*. 2017;4(1):160696.
336. McGuire LI, Poleggi A, Poggiolini I, Suardi S, Grznarova K, Shi S, et al. Cerebrospinal fluid real-time quaking-induced conversion is a robust and reliable test for sporadic creutzfeldt-jakob disease: An international study. *Ann Neurol*. 2016;80(1):160-5.
337. Foutz A, Appleby BS, Hamlin C, Liu X, Yang S, Cohen Y, et al. Diagnostic and prognostic value of human prion detection in cerebrospinal fluid. *Ann Neurol*. 2017;81(1):79-92.
338. Orru CD, Bongiani M, Tonoli G, Ferrari S, Hughson AG, Groveman BR, et al. A test for Creutzfeldt-Jakob disease using nasal brushings. *N Engl J Med*. 2014;371(6):519-29.
339. John TR, Schatzl HM, Gilch S. Early detection of chronic wasting disease prions in urine of pre-symptomatic deer by real-time quaking-induced conversion assay. *Prion*. 2013;7(3):253-8.
340. Cheng YC, Hannaoui S, John TR, Dudas S, Czub S, Gilch S. Early and Non-Invasive Detection of Chronic Wasting Disease Prions in Elk Feces by Real-Time Quaking Induced Conversion. *PLoS One*. 2016;11(11):e0166187.

BIBLIOGRAFÍA

341. Henderson DM, Denkers ND, Hoover CE, Garbino N, Mathiason CK, Hoover EA. Longitudinal Detection of Prion Shedding in Saliva and Urine by Chronic Wasting Disease-Infected Deer by Real-Time Quaking-Induced Conversion. *J Virol.* 2015;89(18):9338-47.
342. Redaelli V, Bistaffa E, Zanusso G, Salzano G, Sacchetto L, Rossi M, et al. Detection of prion seeding activity in the olfactory mucosa of patients with Fatal Familial Insomnia. *Sci Rep.* 2017;7:46269.
343. Atarashi R, Satoh K, Sano K, Fuse T, Yamaguchi N, Ishibashi D, et al. Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. *Nat Med.* 2011;17(2):175-8.
344. Orru CD, Groveman BR, Hughson AG, Zanusso G, Coulthart MB, Caughey B. Rapid and sensitive RT-QuIC detection of human Creutzfeldt-Jakob disease using cerebrospinal fluid. *MBio.* 2015;6(1).
345. Haley NJ, Siepker C, Hoon-Hanks LL, Mitchell G, Walter WD, Manca M, et al. 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.* 2016;54(4):1117-26.
346. Levavasseur E, Biacabe AG, Comoy E, Culeux A, Grznarova K, Privat N, et al. Detection and partial discrimination of atypical and classical bovine spongiform encephalopathies in cattle and primates using real-time quaking-induced conversion assay. *PLoS One.* 2017;12(2):e0172428.
347. Groveman BR, Raymond GJ, Campbell KJ, Race B, Raymond LD, Hughson AG, et al. Role of the central lysine cluster and scrapie templating in the transmissibility of synthetic prion protein aggregates. *PLoS Pathog.* 2017;13(9):e1006623.
348. Erana H, Charco JM, Di Bari MA, Diaz-Dominguez CM, Lopez-Moreno R, Vidal E, et al. Development of a new largely scalable in vitro prion propagation method for the production of infectious recombinant prions for high resolution structural studies. *PLoS Pathog.* 2019;15(10):e1008117.
349. Charco JM. Desarrollo de un nuevo sistema de cribado masivo basado en la propagación in vitro de priones recombinantes infecciosos para la detección de compuestos con actividad anti-priónica: Universidad del País Vasco 2018.
350. Eraña H, Pérez-Castro M, García-Martínez S, Charco JM, López-Moreno R, Díaz-Dominguez CM, et al. A Novel, Reliable and Highly Versatile Method to Evaluate Different Prion Decontamination Procedures. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8:589182.
351. Berrow NS, Alderton D, Sainsbury S, Nettleship J, Assenberg R, Rahman N, et al. A versatile ligation-independent cloning method suitable for high-throughput expression screening applications. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(6):e45.
352. Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* 1990;96(1):23-8.
353. Yuan Q, Telling G, Bartelt-Hunt SL, Bartz JC. Dehydration of Prions on Environmentally Relevant Surfaces Protects Them from Inactivation by Freezing and Thawing. *J Virol.* 2018;92(8).
354. Di Bari MA, Nonno R, Castilla J, D'Agostino C, Pirisinu L, Riccardi G, et al. Chronic wasting disease in bank voles: characterisation of the shortest incubation time model for prion diseases. *PLoS Pathog.* 2013;9(3):e1003219.
355. Rand WM. Objective Criteria for the Evaluation of Clustering Methods. *Journal of the American Statistical Association.* 1971;66(336):846-50.
356. Piening N, Nonno R, Di Bari M, Walter S, Windl O, Agrimi U, et al. Conversion efficiency of bank vole prion protein in vitro is determined by residues 155 and 170, but does not

- correlate with the high susceptibility of bank voles to sheep scrapie in vivo. *J Biol Chem.* 2006;281(14):9373-84.
357. Pirisinu L, Marcon S, Di Bari MA, D'Agostino C, Agrimi U, Nonno R. Biochemical characterization of prion strains in bank voles. *Pathogens.* 2013;2(3):446-56.
 358. Di Bari MA, Chianini F, Vaccari G, Esposito E, Conte M, Eaton SL, et al. The bank vole (*Myodes glareolus*) as a sensitive bioassay for sheep scrapie. *J Gen Virol.* 2008;89(Pt 12):2975-85.
 359. Nonno R, Di Bari MA, Cardone F, Vaccari G, Fazzi P, Dell'Omo G, et al. Efficient transmission and characterization of Creutzfeldt-Jakob disease strains in bank voles. *PLoS Pathog.* 2006;2(2):e12.
 360. Agrimi U, Nonno R, Dell'Omo G, Di Bari MA, Conte M, Chiappini B, et al. Prion protein amino acid determinants of differential susceptibility and molecular feature of prion strains in mice and voles. *PLoS Pathog.* 2008;4(7):e1000113.
 361. González Miranda E. Adaptación de un sistema de propagación de priones in vitro para el cribado masivo de compuestos específicos frente a las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles humanas: Universidad del País Vasco; 2020.
 362. Li J, Browning S, Mahal SP, Oelschlegel AM, Weissmann C. Darwinian evolution of prions in cell culture. *Science.* 2010;327(5967):869-72.
 363. Warner RG, Hundt C, Weiss S, Turnbull JE. Identification of the heparan sulfate binding sites in the cellular prion protein. *J Biol Chem.* 2002;277(21):18421-30.
 364. Timmes AG, Moore RA, Fischer ER, Priola SA. Recombinant prion protein refolded with lipid and RNA has the biochemical hallmarks of a prion but lacks in vivo infectivity. *PLoS One.* 2013;8(7):e71081.
 365. Cartoni C, Schinina ME, Maras B, Nonno R, Vaccari G, Di Baria MA, et al. Identification of the pathological prion protein allotypes in scrapie-infected heterozygous bank voles (*Clethrionomys glareolus*) by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2005;1081(1):122-6.
 366. Watts JC, Giles K, Patel S, Oehler A, DeArmond SJ, Prusiner SB. Evidence that bank vole PrP is a universal acceptor for prions. *PLoS Pathog.* 2014;10(4):e1003990.
 367. Espinosa JC, Nonno R, Di Bari M, Aguilar-Calvo P, Pirisinu L, Fernandez-Borges N, et al. PrPC Governs Susceptibility to Prion Strains in Bank Vole, While Other Host Factors Modulate Strain Features. *J Virol.* 2016;90(23):10660-9.
 368. Telling GC, Parchi P, DeArmond SJ, Cortelli P, Montagna P, Gabizon R, et al. Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science.* 1996;274(5295):2079-82.
 369. Moore RA, Vorberg I, Priola SA. Species barriers in prion diseases--brief review. *Arch Virol Suppl.* 2005(19):187-202.
 370. Beringue V, Herzog L, Jaumain E, Reine F, Sibille P, Le Dur A, et al. Facilitated cross-species transmission of prions in extraneural tissue. *Science.* 2012;335(6067):472-5.
 371. Brandner S, Jaunmuktane Z. Prion disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathol.* 2017;133(2):197-222.
 372. Herbst A, Duque Velasquez C, Triscott E, Aiken J, Mckenzie D. Chronic Wasting Disease Prion Strain Emergence and Host Range Expansion. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(9):1598-600.
 373. Weissmann C, Li J, Mahal SP, Browning S. Prions on the move. *EMBO Rep.* 2011;12(11):1109-17.
 374. Makarava N, Baskakov IV. Genesis of transmissible protein states via deformed templating. *Prion.* 2012;6(3):252-5.

BIBLIOGRAFÍA

375. Deleault NR, Lucassen RW, Supattapone S. RNA molecules stimulate prion protein conversion. *Nature*. 2003;425(6959):717-20.
376. Deleault NR, Harris BT, Rees JR, Supattapone S. Formation of native prions from minimal components in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(23):9741-6.
377. Burke C, Walsh D, Steele A, Agrimi U, Di Bari MA, Watts JC, et al. Full restoration of specific infectivity and strain properties from pure mammalian prion protein. *PLoS Pathog*. 2019;15(3):e1007662.
378. Supattapone S. Cofactor molecules: Essential partners for infectious prions. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2020;175:53-75.
379. Pace CN. Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol*. 1986;131:266-80.
380. Jahan I, Nayeem SM. Effect of Urea, Arginine, and Ethanol Concentration on Aggregation of (179)CVNITV(184) Fragment of Sheep Prion Protein. *ACS Omega*. 2018;3(9):11727-41.
381. Hua L, Zhou R, Thirumalai D, Berne BJ. Urea denaturation by stronger dispersion interactions with proteins than water implies a 2-stage unfolding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(44):16928-33.
382. Yang Z, Xiu P, Shi B, Hua L, Zhou R. Coherent microscopic picture for urea-induced denaturation of proteins. *J Phys Chem B*. 2012;116(30):8856-62.
383. Honda R. Role of the Disulfide Bond in Prion Protein Amyloid Formation: A Thermodynamic and Kinetic Analysis. *Biophys J*. 2018;114(4):885-92.
384. Apetri AC, Surewicz WK. Kinetic intermediate in the folding of human prion protein. *J Biol Chem*. 2002;277(47):44589-92.
385. Surewicz WK, Apostol MI. Prion protein and its conformational conversion: a structural perspective. *Top Curr Chem*. 2011;305:135-67.
386. Apetri AC, Maki K, Roder H, Surewicz WK. Early intermediate in human prion protein folding as evidenced by ultrarapid mixing experiments. *J Am Chem Soc*. 2006;128(35):11673-8.
387. Hosszu LL, Wells MA, Jackson GS, Jones S, Batchelor M, Clarke AR, et al. Definable equilibrium states in the folding of human prion protein. *Biochemistry*. 2005;44(50):16649-57.
388. Colby DW, Prusiner SB. De novo generation of prion strains. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(11):771-7.
389. Adjou KT, Deslys J-P, Demaimay R, Seman M, Dormont D. Prospects for the Pharmacological Treatment of Human Prion Diseases. *CNS Drugs*. 1998;10(2):83-9.
390. Beringue V, Adjou KT, Lamoury F, Maignien T, Deslys JP, Race R, et al. Opposite effects of dextran sulfate 500, the polyene antibiotic MS-8209, and Congo red on accumulation of the protease-resistant isoform of PrP in the spleens of mice inoculated intraperitoneally with the scrapie agent. *J Virol*. 2000;74(12):5432-40.
391. Caughey B, Raymond GJ. Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells. *J Virol*. 1993;67(2):643-50.
392. Shyng SL, Lehmann S, Moulder KL, Harris DA. Sulfated glycans stimulate endocytosis of the cellular isoform of the prion protein, PrP^C, in cultured cells. *J Biol Chem*. 1995;270(50):30221-9.
393. Murayama Y, Yoshioka M, Masujin K, Okada H, Iwamaru Y, Imamura M, et al. Sulfated dextrans enhance in vitro amplification of bovine spongiform encephalopathy PrP(Sc) and enable ultrasensitive detection of bovine PrP(Sc). *PLoS One*. 2010;5(10).
394. Caughey B, Brown K, Raymond GJ, Katzenstein GE, Thresher W. Binding of the protease-sensitive form of PrP (prion protein) to sulfated glycosaminoglycan and congo red corrected. *J Virol*. 1994;68(4):2135-41.

395. Brimacombe DB, Bennett AD, Wusteman FS, Gill AC, Dann JC, Bostock CJ. Characterization and polyanion-binding properties of purified recombinant prion protein. *Biochem J.* 1999;342 Pt 3:605-13.
396. Appel TR, Dumpitak C, Matthiesen U, Riesner D. Prion rods contain an inert polysaccharide scaffold. *Biol Chem.* 1999;380(11):1295-306.
397. Supattapone S, Nguyen HO, Cohen FE, Prusiner SB, Scott MR. Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(25):14529-34.
398. Wong C, Xiong LW, Horiuchi M, Raymond L, Wehrly K, Chesebro B, et al. Sulfated glycans and elevated temperature stimulate PrP(Sc)-dependent cell-free formation of protease-resistant prion protein. *EMBO J.* 2001;20(3):377-86.
399. Shaked GM, Meiner Z, Avraham I, Taraboulos A, Gabizon R. Reconstitution of prion infectivity from solubilized protease-resistant PrP and nonprotein components of prion rods. *J Biol Chem.* 2001;276(17):14324-8.
400. Farquhar CF, Dickinson AG. Prolongation of scrapie incubation period by an injection of dextran sulphate 500 within the month before or after infection. *J Gen Virol.* 1986;67 (Pt 3):463-73.
401. Chen SG, Teplow DB, Parchi P, Teller JK, Gambetti P, Autilio-Gambetti L. Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases. *J Biol Chem.* 1995;270(32):19173-80.