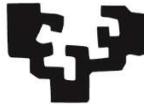


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Estudio de la diversidad de variantes polimórficas de las proteínas del prion de cérvidos, su capacidad de malplegamiento e influencia sobre la emergencia de cepas con características distintivas

CARLOS MIGUEL DÍAZ DOMÍNGUEZ

LEIOA, 2022

Tesis Doctoral:

Estudio de la diversidad de variantes polimórficas de las proteínas del prion de cérvidos, su capacidad de malplegamiento e influencia sobre la emergencia de cepas con características distintivas

CARLOS MIGUEL DÍAZ DOMÍNGUEZ

LEIOA, 2022

DIRECTORES:

Dr. Joaquín Castilla Castrillón

Dr. Hasier Eraña Lasagabaster

TUTOR:

Dr. Carlos Matute Dalmau

ABREVIATURAS/GLOSARIO

ABREVIATURAS/GLOSARIO

- μg : microgramo, unidad de la propiedad Masa
- μl : microlitro, unidad de la propiedad Volumen
- μm : micrómetro, unidad de la propiedad Longitud
- μM : micromolar, unidad de la propiedad Molaridad (concentración)
- Å: Ångstrom, unidad de la propiedad Longitud equivalente a 10^{-10} metros
- ° C: grado centígrado, unidad de la propiedad Temperatura
- %: tanto por ciento
- 263K: cepa clásica de prion de hámster
- 12B2: anticuerpo monoclonal anti-PrP con epítipo en la región N-terminal
- 9A2: anticuerpo monoclonal anti-PrP con epítipo en la región N-terminal
- 2D: dos dimensiones, bidimensional
- 2G11: anticuerpo monoclonal anti-PrP utilizado en estudios inmunohistoquímicos
- 3D: tres dimensiones, tridimensional
- 4R β S: modelo de lámina- β en solenoide de cuatro pisos
- 7D9: anticuerpo monoclonal anti-PrP con epítipo en la región N-terminal

A

- AFM: del inglés, *atomic force microscopy*
- A β : péptido beta-amiloide
- AD: del inglés, *Alzheimer disease*
- ARQ: polimorfismo de la PrP ovina (Ala136 – Arg154 – Gln171)
- ARR: polimorfismo de la PrP ovina (Ala136 – Arg154 – Arg171)

B

- BSE: del inglés, *Bovine Spongiform Encephalopathy*

C

- C57BL/6: modelo murino silvestre ampliamente utilizado en investigación
- CB: del inglés, *conversión buffer*
- CC: del inglés, *charged cluster*
- CD: del inglés, *Circular Dichroism*
- CJD: del inglés, *Creutzfeldt-Jakob Disease*
- CPEB: del inglés, *cytoplasmic polyadenylation element binding protein*
- CMV: cytomegalovirus
- C-terminal: extremo carboxilo terminal
- CWD: del inglés, *Chronic Wasting Disease*

ABREVIATURAS/GLOSARIO

- cryoEM: del inglés, *cryogenic Electron Microscopy*

D

- Da: Dalton, unidad de la propiedad Masa equivalente a $1.660\ 5402(10)\times 10^{-27}$ kg
- DAB: diaminobencidina
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- DNAsa: desoxirribonucleasa
- dNTP: del inglés, *deoxynucleotide triphosphates*
- DO₆₀₀: densidad óptica a 600 nm
- dpi: días post-inoculación
- DY: *Drowsy*, cepa de prion de hámster
- D18: anticuerpo monoclonal anti-PrP con epítipo en la región central

E

- *E. coli*: *Escherichia coli*, bacteria gramnegativa de la familia de las enterobacterias
- EDTA: etilendiaminotetraacético
- EET: encefalopatía espongiforme transmisible
- EPR: del inglés, *electronic Paramagnetic Resonance*

F

- F: del inglés, *forward*
- fCJD: del inglés, *familial Creutzfeldt-Jakob Disease*
- FFI: del inglés, *Fatal Familial Insomnia*
- FSE: del inglés, *Feline Spongiform Encephalopathy*
- FTD: del inglés, *Frontotemporal Dementia*
- FTIR: del inglés, *fourier transform infrared spectroscopy*

G

- *g*: fuerza centrífuga relativa, unidad de la propiedad Aceleración
- GC: del inglés, GC box, motivo del DNA rico en guanina y citosina
- gCJD: del inglés, *genetic Creutzfeldt-Jakob Disease*
- GPI: del inglés, *glycosylphosphatidylinositol*
- GSS: Gerstmann-Sträussler-Scheinker
- Gdn-HCl: hidrocloreuro de guanidinio

ABREVIATURAS/GLOSARIO

H

- h: hora, unidad de la propiedad Tiempo
- HC: del inglés, *hydrofobic core*
- HE: tinción hematoxilina-eosina
- HET-S: proteína fúngica que regula la incompatibilidad del heterocarión
- HSP: del inglés, *heat shock protein*
- HY: *Hyper*, cepa de prion de hámster

I

- ic: vía de inoculación intracerebral
- iCJD: del inglés, *iatrogenic Creutzfeldt-Jakob Disease*
- IHQ: inmunohistoquímica
- ip: vía de inoculación intraperitoneal
- IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
- iv: vía de inoculación intravenosa

K

- kDa: kiloDalton, unidad de la propiedad Masa
- 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

M

- M: molar, unidad de la propiedad Molaridad (concentración)
- M20: anticuerpo monoclonal anti-PrP con epítipo en la región C-terminal
- MBM: del inglés, *meat-bone-meal*
- MD: del inglés, *Molecular Dynamics*
- ME7: cepa de prion de ratón
- mg: miligramo, unidad de la propiedad Masa
- min: minute, unidad de la propiedad Tiempo
- ml: mililitro, unidad de la propiedad Volumen
- mm: milímetro, unidad de la propiedad Longitud
- mM: milimolar, unidad de la propiedad Molaridad (concentración)

ABREVIATURAS/GLOSARIO

- MAVS: del inglés, *Mitochondrial Antiviral Signaling*

N

- ng: nanogramo, unidad de la propiedad Masa
- nm: nanómetro, unidad de la propiedad Longitud
- N-terminal: extremo amino terminal
- Nor98: cepa de prion ovino atípica

O

- o/n: del inglés, *over night*
- OPRI: del inglés, *Octapeptide Repeat Insertions*
- OPRD: del inglés, *Octapeptide Repeat Deletions*
- ORF: del inglés, *Open Reading Frame*
- OR: del inglés, *octapeptide repeats*

P

- p/v: peso/volumen
- pb: pares de bases
- PBS: del inglés, *phosphate buffered saline*
- PCR: del inglés, *polymerase chain reaction*
- PD: del inglés, *Parkinson disease*
- PIRIBS: modelo de lámina- 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
- *PRNP*: gen que codifica la proteína PrP
- *PRNP*^{-/-}: animal transgénico KO para el gen que codifica la proteína PrP
- *PRNP*^{+/-}: animal transgénico hemicígote para el gen que codifica la proteína PrP
- *PRNP*^{+/+}: animal transgénico homocigoto para el gen que codifica la proteína PrP
- PrP: 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
- PrP^{res}: PrP resistente a la digestión con PK

ABREVIATURAS/GLOSARIO

- PrP^{Sc}: del inglés, *Scrapie associated Prion Protein*
- PVDF: polifluoruro de vinilideno

Q

- QUIC: del inglés, *Quaking Induced Conversión*

R

- R: del inglés, *reverse*
- rec-PrP: PrP recombinante
- rec-PrP^{res}: PrP recombinante malplegada resistente a PK
- RER: retículo endoplasmático rugoso
- RL: del inglés, *Rigid Loop*
- RML: cepa de prion ovino adaptado a ratón en el *Rocky Mountain Laboratory*
- RMN: Resonancia Magnética Nuclear
- RNA: ácido ribonucleico
- RNAm: ácido ribonucleico mensajero
- rpm: revoluciones por minuto, unidad de la propiedad Frecuencia
- RT-QuIC: del inglés, *Real Time - Quaking Induced Conversion*

S

- s: segundo, unidad de la propiedad Tiempo
- SAF84: anticuerpo monoclonal anti-PrP con epítipo en la región central
- SAXS: del inglés, *Small angle X-ray Scattering*
- sCJD: del inglés, *sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease*
- SDS: del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate*
- SEM: error estándar de la media
- sFI: del inglés, *sporadic Fatal Insomnia*
- Sinc: gen Sinc, del inglés, *Scrapie Incubation*
- SIP: gen *SIP*, del inglés, *Shorter Incubation Period*
- SLS: del inglés, *Static light Scattering*
- SNC: Sistema Nervioso Central
- SRP: del inglés, *Signal Recognition Particle*
- ssNMR: del inglés *solid-state Nuclear Magnetic Resonance*
- Sup35: gen de levadura que codifica un factor terminador de transcripción
- SDS-PAGE: del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

ABREVIATURAS/GLOSARIO

I

- Tris-HCl: tris(hidroximetil)aminometano hidrocloreuro
- TEM: del inglés, *Transmission Electron Microscopy*
- ThT: del inglés, *Thioflavine T*
- TME: del inglés, *Transmissible Mink Encephalopathy*

U

- Ure2: gen de levadura que codifica un transportador de ureidosuccinato
- UPS: del inglés,
- UV: radiación ultravioleta

V

- V: voltio, unidad de la propiedad Potencial Eléctrico
- v/v: volumen/volumen
- vCJD: del inglés, *variant Creutzfeldt-Jakob Disease*
- VPSP: del inglés, *Variably Protease-Sensitive Prionopathy*
- VRQ: polimorfismo de la PrP ovina (Val136 – Arg154 – Gln171)

W

- WT: del inglés, *Wild-Type*

Tabla de los 20 aminoácidos, incluyendo su abreviatura y su 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

Abreviaturas/Glosario	1
Índice	9
Resumen/Summary	15
Introducción	19
1. Sobre las encefalopatías espongiformes transmisibles y la determinación de su agente causal	25
1.1. Hacia la definición de encefalopatía espongiforme transmisible	25
1.1.1. Primeros casos descritos o por qué “no hay que mezclar churras con merinas”	25
1.1.2. Aproximación a las encefalopatías espongiformes transmisibles en humanos.....	26
1.1.3. Desentrañando el arcano de las encefalopatías espongiformes transmisibles: el agente causal	31
1.1.3.1. Formulando la hipótesis “solo proteína”	33
1.1.3.2. Confirmando la hipótesis “solo proteína”	36
1.2. Historia moderna de las encefalopatías espongiformes transmisibles.....	43
1.2.1. La encefalopatía espongiforme bovina: la primera zoonosis	43
1.2.2. Revisitando las enfermedades priónicas humanas.....	45
1.2.3. Las encefalopatías espongiformes transmisibles en la actualidad	48
2. Biología de los priones	49
2.1. PrP ^C	50
2.1.1. Genética de la PrP ^C	50
2.1.2. Biosíntesis y componentes de la PrP ^C	52
2.1.3. Posibles funciones de la PrP ^C	57
2.2. PrP ^{Sc}	58
2.2.1. Heterogeneidad de la PrP ^{Sc}	58
2.2.2. Modelos estructurales de la PrP ^{Sc}	60
2.2.3. Neurotoxicidad de la PrP ^{Sc}	66
2.3. Mecanismos de conversión.....	68
2.3.1. Primeras aproximaciones: modelos teóricos de conversión	69
2.3.1.1. Modelo de conversión inducida por molde.....	69
2.3.1.2. Modelo de nucleación-polimerización	70
2.3.2. Hacia nuevas aproximaciones: cinética y dinámica de la conversión.....	71
2.4. Transmisión de priones	74
2.4.1. Vías de entrada y diseminación por el organismo	74
2.4.2. Barrera de transmisión y fenómeno de cepa.....	76
3. Modelos experimentales para la propagación y el estudio de priones	84
3.1. Primeros métodos de propagación de priones <i>in vitro</i>	85
3.2. Amplificación cíclica de proteínas malplegadas: PMCA	86
3.3. Amplificación cíclica de proteínas malplegadas por agitación: PMSA	88
4. Enfermedad debilitante crónica	89
Hipótesis y Objetivos	93
Materiales y Métodos.....	95
1. Construcción de los plásmidos de expresión de las PrP de corzo y uapití, las PrP de cérvidos con los polimorfismos descritos en la naturaleza, la PrP de cérvido con delección en el extremo C-terminal y PrP de otras especies utilizadas en su caracterización	96
1.1. Generación de plásmidos con PrP de distintas especies mediante recombinación homóloga	96
1.2. Generación del plásmido con PrP de uapití mediante mutagénesis dirigida.....	100
1.3. Generación del resto de plásmidos mediante síntesis génica y subclonaje en pOPINE	102

ÍNDICE

2. Obtención de proteínas del prion recombinantes	102
2.1. Transformación en bacterias <i>E. Coli</i> Rosetta (DE3) TM	103
2.2. Expresión y purificación de las PrP recombinantes para su posterior uso en sistemas de propagación <i>in vitro</i>	103
3. PMSA para la generación y propagación de priones <i>in vitro</i>	105
3.1. Preparación de sustratos para PMSA	105
3.2. Estudio de la adsorción de PrP recombinante a partículas esféricas de vidrio	106
3.3. PMSA para la generación espontánea de priones recombinantes <i>in vitro</i>	106
3.4. Adsorción de rec-PrPres a partículas esféricas de zirconia – sílice	107
3.5. PMSA para la propagación de priones recombinantes <i>in vitro</i>	108
4. PMCA para la propagación de priones <i>in vitro</i> en sustratos basados en homogeneizados de encéfalo.	109
4.1. Preparación de sustratos para PMCA basados en homogeneizados de encéfalo	109
4.2. Propagación de priones recombinantes en PMCA para la determinación de la potencial infectividad <i>in vivo</i>	110
5. Detección de PrP malplegada resistente a la digestión por proteasa o PrP^{res}	111
5.1. Digestión de PrP malplegada mediante tratamiento con proteinasa K	111
5.2. Detección de proteínas mediante electroforesis y tinción de proteína total	117
5.3. Detección de proteínas mediante electroforesis y <i>Western blot</i>	117
6. Estudios de infectividad <i>in vivo</i>	114
6.1. Modelos de experimentación y seguimiento	114
6.2. Entidades colaboradoras y cumplimiento de las normativas éticas	115
7. Estudios anatomopatológicos	116
7.1. Detección de PrP ^{res} y toma de imágenes	116
7.2. Evaluación y elaboración del perfil lesional	117
Resultados	119
1. Malplegamiento espontáneo <i>in vitro</i> de las PrP recombinantes de corzo y uapití	120
1.1. Obtención de PrP recombinantes de corzo y uapití	120
1.2. Determinación de una metodología eficiente para el malplegamiento espontáneo <i>in vitro</i> de las PrP recombinantes de corzo y uapití	121
1.2.1. Estudio del efecto de la superficie de vidrio en el malplegamiento espontáneo <i>in vitro</i> de las PrP recombinantes de corzo y uapití	121
1.2.2. Comparación de dos metodologías <i>in vitro</i> basadas en pases seriados para la obtención de PrP recombinantes de corzo y uapití malplegadas espontáneamente	126
2. Caracterización bioquímica de las PrP recombinantes de corzo y uapití obtenidas por malplegamiento espontáneo <i>in vitro</i> y desarrollo de un panel para la discriminación de potenciales confórmers diferentes	127
3. Impacto del cofactor en el malplegamiento espontáneo y propagación <i>in vitro</i> de las PrP recombinantes de corzo y uapití	139
4. Caracterización biológica de las PrP recombinantes de corzo y uapití malplegadas espontáneamente <i>in vitro</i> en presencia y ausencia de cofactor mediante inoculación en un modelo susceptible	148
5. Efecto de los diferentes polimorfismos descritos en la PrP de cérvidos sobre su capacidad de malplegamiento espontáneo <i>in vitro</i>	166
5.1. Obtención de PrP recombinantes de cérvidos con sustituciones aminoacídicas	166
5.2. Malplegamiento espontáneo <i>in vitro</i> de las variantes polimórficas de las PrP recombinantes de cérvidos	168

ÍNDICE

5.3. Caracterización bioquímica de las variantes polimórficas de las PrP recombinantes de cérvidos malplegadas espontáneamente <i>in vitro</i>	173
6. Relevancia del residuo 226 en las características de las PrP recombinantes de cérvidos malplegadas espontáneamente <i>in vitro</i>	181
6.1. Efecto de la presencia de los aminoácidos glutamina o glutamato en el residuo 226 de la PrP sobre las características de las PrP recombinantes de corzo y uapití malplegadas espontáneamente <i>in vitro</i>	181
6.2. Evolución de las características bioquímicas de las variantes polimórficas de las PrP recombinantes de cérvidos malplegadas espontáneamente <i>in vitro</i> tras su adaptación a la secuencia aminoacídica de la PrP de corzo	186
7. Rol del extremo C-terminal en el malplegamiento de las PrP de cérvidos.....	193
7.1. Efecto del extremo C-terminal de la PrP en la evolución de las características de las PrP recombinantes de corzo y uapití malplegadas espontáneamente <i>in vitro</i>	194
7.2. Efecto del extremo C-terminal de la PrP de cérvido en el malplegamiento espontáneo <i>in vitro</i> y en la evolución de sus características.....	198
Discusión	203
Conclusiones	223
Referencias.....	228

RESUMEN/SUMMARY

RESUMEN/SUMMARY

Las encefalopatías espongiformes transmisibles o enfermedades priónicas son un conjunto de desórdenes neurodegenerativos de resultado invariablemente letal que afectan a los mamíferos. El agente causal de estas enfermedades es el prion o PrP^{Sc}, la isoforma patógena de la proteína priónica celular o PrP^C. El proceso de malplegamiento por el que la PrP^C se convierte en PrP^{Sc} puede ocurrir de manera espontánea o adquirida, pudiendo estar ambos eventos modulados por la presencia de sustituciones aminoacídicas o polimorfismos. En el caso de las enfermedades priónicas de origen espontáneo, se han descrito numerosas variantes aminoacídicas que promueven el malplegamiento, dando lugar a las enfermedades priónicas hereditarias o familiares. Por su parte, en las prionopatías adquiridas, diferencias entre las secuencias de PrP^C del receptor y la PrP^{Sc} del hospedador original puede resultar en alteraciones en las propiedades de la cepa priónica original, pudiendo también afectar a la barrera de transmisión. En este respecto, dada la abundancia de polimorfismos en las PrP^C de la familia *Cervidae*, la posible emergencia de nuevas cepas priónicas de cérvidos que superen la barrera de transmisión e infecten al ser humano constituiría un escenario alarmante. La enfermedad priónica que afecta a los cérvidos, la caquexia crónica, se encuentra actualmente extendida por gran parte de Estados Unidos y Canadá, además de describirse casos en Corea del Sur, Noruega, Finlandia y Suecia. Una de las principales características de esta enfermedad es su elevada transmisión horizontal, la cual, junto con los numerosos polimorfismos descritos en las PrP de cérvidos, podría fomentar la aparición de nuevas cepas priónicas, como las encontradas en el norte de Europa.

Con el objetivo de analizar el efecto de los polimorfismos descritos en las proteínas del prion de cérvidos en el malplegamiento y la emergencia de nuevas cepas, utilizamos la técnica de la PMSA para la obtención de distintos confórmeros mediante malplegamiento espontáneo *in vitro* de las PrP recombinantes de corzo y uapití, que se clasificaron en diferentes potenciales cepas de acuerdo con sus propiedades bioquímicas. Tras demostrar que estos confórmeros presentaban las características propias de los priones *bona fide*, siendo capaces de inducir una enfermedad priónica en modelos animales, se llevó a cabo el malplegamiento espontáneo *in vitro* de todas las variantes polimórficas de las PrP de cérvidos, evaluando el efecto de cada polimorfismo en el malplegamiento espontáneo y en la emergencia de potenciales cepas. Además, el mismo sistema permitió evaluar también el efecto del residuo 226 de las PrP de cérvidos en la evolución de las potenciales cepas de corzo y uapití, así como el efecto de la glutamina en esa posición en la transmisión de las potenciales cepas obtenidas mediante el malplegamiento espontáneo *in vitro* de todas las variantes polimórficas, simulando su transmisión al genotipo más frecuente. Finalmente, una vez establecida la importancia del residuo 226 y del extremo C- terminal de la PrP, se analizó el rol de esta región en mayor detalle. De esta forma, presentamos un sistema de gran utilidad para modelar la

RESUMEN/SUMMARY

emergencia y evolución de cepas priónicas basado en el malplegamiento y transmisión *in vitro* de las variantes polimórficas descritas en las PrP de la familia *Cervidae*, que podría ayudar a entender y predecir la formación de nuevos priones de cérvido.

RESUMEN/SUMMARY

Transmissible spongiform encephalopathies are a group of neurodegenerative and invariably fatal disorders that affects mammals. The causal agent of these diseases is the prion or PrP^{Sc}, the pathogenic isoform of the cellular prion protein or PrP^C. The misfolding event by which PrP^C turns into PrP^{Sc} can take place in a spontaneous or in an acquired manner. In both cases, the presence of amino acid substitutions or polymorphisms in the PrP can affect to the event. Regarding the spontaneous misfolding, numerous polymorphisms that promote it have been described, leading to the development of familial or hereditary forms of prion disease. In the case of the acquired prion diseases, the presence of amino acid substitutions between the PrP^C from the host and the PrP^{Sc} from the donor can modify the prion strains characteristics upon transmission, including the transmission barrier and therefore, the host range. Thus, the possibility of the emergence of new cervid prion strains able to overcome the transmission barrier and infect humans constitutes an increasing concern. The prion disease affecting cervids, chronic wasting disease, is nowadays widely extended all along USA and Canada, with few cases described in South Korea and recently detected in Norway, Finland, and Sweden. The characteristic high horizontal transmission capacity of chronic wasting disease, together with the numerous polymorphisms described in cervid PrP, could give rise to the emergence of new prion strains, as the ones found in the North of Europe.

In this context, with the aim of analysing the effect of the distinct polymorphic PrP variants from cervids on their misfolding and emergence of new strains, we used the PMSA technique to obtain *in vitro* distinct conformers through spontaneous misfolding of the deer and elk PrP, which were classified as potentially different prion strains according to their biochemical characterization. After proving that these conformers misfolded *in vitro* showed all the features expected for *bona fide* prions, including the ability to induce a prion disease in animal models, we performed *in vitro* spontaneous misfolding experiments with every polymorphic variant of cervid PrP in order to evaluate their effect in the spontaneous misfolding event and in the generation of potentially different prion strains. The same *in vitro* prion propagation system was also used to assess the impact of residue 226 of cervid PrP in the evolution of the recombinant deer and elk prion strains generated previously, as well as in the transmission of those prions generated spontaneously from all polymorphic variants, simulating their transmission to the most common genotype. Finally, once the relevance of residue 226 was established, we performed a more detailed analysis of the role of the C- terminal domain of the cervid PrP. Thus, we present a highly useful system to model the emergence and evolution of prion strains, based on the *in vitro* misfolding and transmission of the polymorphic variants of cervid PrP that could help to understand and predict the emergence of new cervid prions.

RESUMEN/SUMMARY

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.- Sobre las encefalopatías espongiformes transmisibles y la determinación de su agente causal

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (TSE, por sus siglas del inglés, *transmissible spongiform encephalopathy*), también conocidas como enfermedades priónicas o prionopatías, son un conjunto de enfermedades neurodegenerativas que afectan a diferentes especies de mamíferos y cuyo devenir es invariablemente el deceso del individuo (1). Entre las especies afectadas destaca el ser humano, en el que se han descrito la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD, del inglés, *Creutzfeldt-Jakob disease*), el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), el insomnio familiar letal (FFI, del inglés, *familial fatal insomnia*) y prionopatía con sensibilidad variable a proteasas (VPSPr, del inglés, *variable proteases-sensitive prionopathy*) (2). Entre las prionopatías descritas en otros mamíferos, se distinguen por su importancia socioeconómica la tembladera (*scrapie*, en inglés) en cabras, ovejas y muflones, la caquexia crónica (CWD, del inglés, *chronic wasting disease*) en cérvidos y, en especial, la encefalopatía espongiforme bovina (BSE, del inglés *bovine spongiform encephalopathy*), que afecta a bóvidos y fue la causante de la epidemia del “mal de las vacas locas” a finales del siglo XX. Otras especies de mamíferos en los que se observan enfermedades priónicas son el visón, afectado por la encefalopatía transmisible del visón (TME, del inglés, *transmissible mink encephalopathy*), el gato doméstico, por la encefalopatía espongiforme felina (FSE, del inglés, *feline spongiform encephalopathy*), ungulados como el nyala y el kudu mayor, por la encefalopatía de ungulados exóticos (EUE, del inglés, *exotic ungulate encephalopathy*) y el dromedario, por la enfermedad priónica de camélidos (CPD, del inglés *camel prion disease*) (3, 4). A excepción de la CWD, el resto de enfermedades priónicas no humanas únicamente se han observado en animales domésticos o en cautividad, teorizándose el consumo de carne infectada por priones como la causa más probable de la mayoría ellas. De nuevo a excepción de la caquexia crónica, todas las TSE se consideran enfermedades raras debido a su baja incidencia, siendo un ejemplo de ello la incidencia anual de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, la cual es aproximadamente de 1,5 casos por millón de habitantes (en lo respectivo a la CWD, la enfermedad está muy extendida y afecta a un gran número de animales debido a su alta transmisibilidad).

Una de las principales características de las TSE son sus largos tiempos de incubación, los cuales van seguidos de una rápida progresión de la enfermedad. En las prionopatías humanas, el tiempo que transcurre desde el inicio de los signos y síntomas clínicos hasta el fatal desenlace oscila entre los 6 meses y los 2 años de media, aunque pueden darse variantes con una progresión más lenta. Los signos clínicos son muy heterogéneos entre las diferentes TSE, pero todas ellas tienen en común una alteración del

INTRODUCCIÓN

comportamiento, una ataxia cerebelar y una disfunción motora y cognitiva progresiva. Debido a que comparten muchos de esos signos clínicos con otras enfermedades neurodegenerativas, el diagnóstico definitivo de las enfermedades priónicas es el estudio anatomopatológico *post mortem* del cerebro del individuo afectado. De este modo se puede observar una característica espongiosis en la materia gris derivada de la muerte de neuronas, siendo el signo clínico que da nombre a este grupo de enfermedades. Otros signos clínicos representativos de las TSE son una gliosis activa en la que participan tanto células de la glía como astrocitos y la acumulación de proteína malplegada, formando desde pequeños agregados hasta placas y depósitos de mayor tamaño (Figura 1). Aunque estos signos neuropatológicos estén presentes en todas las prionopatías, tanto su distribución en las diferentes áreas del cerebro como su gravedad puede variar entre diferentes enfermedades priónicas y, en ocasiones, entre individuos con la misma enfermedad (5).

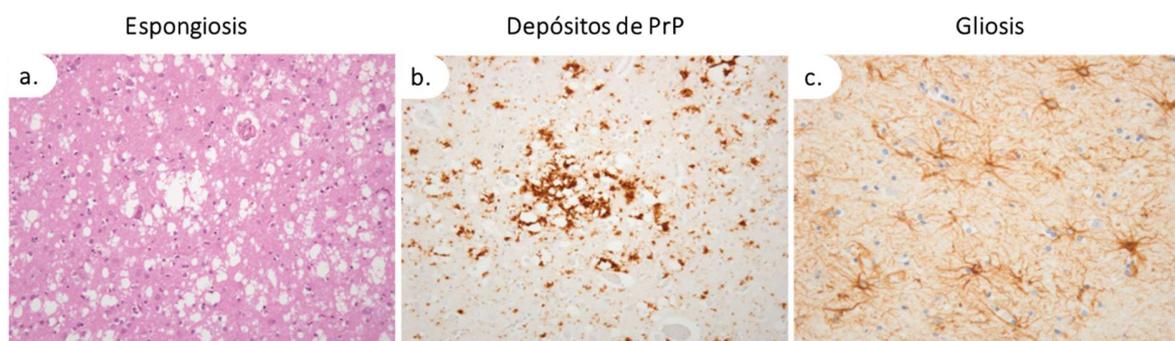


Figura 1. Anomalías neuropatológicas observadas en encéfalos de individuos afectados por una enfermedad priónica. a) Imagen del córtex frontal de un paciente con CJD donde se observa vacuolización o lesiones espongiformes. Tinción con hematoxilina - eosina (H/E). 20x **b)** Imagen de depósito perivacuolar de PrP detectado en el córtex frontal de un paciente con CJD. Tinción con el anticuerpo anti-PrP 12F10. 20x **c)** Imagen de gliosis reactiva aumentada en el tálamo de un paciente con FFI. Tinción con el anticuerpo anti-Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP, del inglés, *Glial Fibrillary Acidic Protein*). 40x. Modificado de Ironside 2017; Budka 1995.

El evento central que desencadena el resto de signos clínicos es la acumulación de proteína malplegada previamente mencionado. Esta proteína, denominada prion o PrP^{Sc} (del inglés, *prion protein scrapie*) es la isoforma malplegada de la proteína priónica fisiológica o PrP^C (del inglés, *prion protein cellular*). Además de ser la causante de la neurotoxicidad, la PrP^{Sc} posee la capacidad de inducir el malplegamiento a otras moléculas de PrP^C, modificando las propiedades bioquímicas y biológicas de las mismas al cambiar su conformación. Entre esas modificaciones destacan la insolubilidad incluso en presencia de detergentes no iónicos, la resistencia parcial a proteasas y la tendencia a agregarse, formando los depósitos característicos de las prionopatías. La capacidad autopropagativa del agente

INTRODUCCIÓN

causal conlleva otro factor importante de las TSE, su potencial transmisibilidad, la última de las características principales que bautiza a este grupo de enfermedades (5).

1.1.- Hacia la definición de encefalopatía espongiforme transmisible

Aunque se han esbozado las líneas generales de las encefalopatías espongiformes transmisibles (TSE), la aparente discordancia entre su carácter infeccioso y transmisible y la posibilidad de formas espontáneas de enfermedad, junto con la naturaleza sin precedentes del agente causal, supuso una odisea de más de 200 años desde la aparición de los primeros casos conocidos y registrados de una enfermedad priónica hasta su correcta definición y clasificación.

1.1.1.- Primeros casos descritos o por qué “no hay que mezclar churras con merinas”

El primer registro documentado de TSE data de 1732, año en el que granjeros británicos piden al Parlamento que se tomen medidas legales para regular la importación de ovejas. Esta petición estuvo motivada por un brote en el condado de Lincolnshire, Inglaterra, de una enfermedad ovina introducida por ovejas merinas de origen español, el *scrapie* o tembladera (6). Aunque en 1755 un grupo de criadores de ovejas ya dejó testimonio en la Casa de los Comunes de que esta enfermedad se transmitía entre ovejas y carneros por la sangre y que podía permanecer en ella entre doce meses y dos años antes de que se manifestase, no fue hasta 1788 y 1811 cuando se publicaron los primeros informes de carácter científico, en la *Agricultural Improvement Society of Bath* y en la *General View of the Agriculture of Wiltshire*, respectivamente. Fue en este informe de 1811 donde Thomas Davies enumera por vez primera los signos clínicos de la tembladera, como los característicos temblores o sacudidas en los cuartos traseros, y establece una relación entre los casos observados en Wiltshire y Lincolnshire ochenta años antes. Cuatro años más tarde, en 1815, un nuevo informe vuelve a centrarse en la tembladera, esta vez en la *General View of the Agriculture of Dorsetshire*, en el que se hipotetiza sobre una cada vez más clara naturaleza infecciosa de la enfermedad y también un componente hereditario, remarcando la imposibilidad hasta el momento de identificar su agente causal ni un potencial tratamiento (7).

Entre las causas propuestas durante estos primeros años de incertidumbre, destacan las originales teorías de Roche-Lubin sobre una relación de la tembladera con la hiperactividad sexual de las ovejas o incluso con tormentas eléctricas y la conjetura hecha por M'Gowan de que el parásito protozoario *Sarcosporidium* pudiera ser el agente causal (7). No obstante, no fue hasta 1936 cuando se produjo un avance importante en la caracterización del agente causal. Dicho avance vino de la mano de los franceses Cuillé y Chelle, los cuales demostraron la naturaleza transmisible de la tembladera y el carácter

INTRODUCCIÓN

transmisible de su agente causal (8). Estos hechos fueron recibidos con cierta reticencia y escepticismo, por lo que en el 1938 William Gordon repitió el experimento de Cuillé y Chelle en el prestigioso Instituto Moredun de Edimburgo inoculando médula espinal procedente de ovejas con tembladera un total de 697 animales, de los cuales 200 desarrollaron la enfermedad (9). Además, y de forma fortuita, Gordon demostró la transmisibilidad de la tembladera a través de vacunas basadas en cerebros de oveja fijados en formalina, compuesto con propiedades desinfectantes y biocidas (9). Los estudios sobre el agente causal de la tembladera fueron continuados por Wilson, Anderson y Smith en el Instituto de Moredun, los cuales demostraron su resistencia a las altas temperaturas y a radiaciones ionizantes y confirmaron su naturaleza filtrable y su resistencia a la formalina (10, 11). Sin embargo, lo heterodoxo de este agente y la suspicacia que generaba en la comunidad científica hicieron que durante mucho tiempo se mostraran reacios a publicar estos estudios e hicieran falta nuevos descubrimientos para avanzar en la caracterización del esquivo agente causal de la tembladera en particular y de las aún por describir encefalopatías espongiiformes transmisibles en general (7).

1.1.2.- Aproximación a las encefalopatías espongiiformes transmisibles en humanos

Debido a las características clínicas de las TSE y su difícil diagnóstico, no es descabellado asumir que, aunque no existan casos documentados, este grupo de enfermedades ha acompañado al ser humano desde sus inicios. Los primeros registros de lo que más tarde se han considerado enfermedades priónicas humanas se atribuyen a los neurólogos alemanes Hans-Gerhard Creutzfeldt y Alfons Maria Jakob. En 1920, Creutzfeldt publicó un caso clínico en el que describía una neuropatía de rápida evolución, muy similar a las descritas por Jakob en tres casos clínicos publicados en 1921 (12, 13). Esta neuropatía fue bautizada como la enfermedad de Creutzfeld-Jakob (CJD) en 1922 por el también neurólogo alemán Walther Spielmeyer (14). Sin embargo, años más tarde y a la luz de nuevos estudios histopatológicos, se demostró que el caso descrito por Creutzfeldt no se correspondía con la enfermedad que posteriormente llevaría su nombre y sólo dos de los cinco casos descritos por Jakob a lo largo de la década de 1920 sí se ajustaban a dicha neuropatía. Curiosamente, cuando la CJD fue bautizada como tal en 1922, el propio Creutzfeldt afirmaba que la neuropatía del caso que había descrito, si bien similar, no era la misma que la de los casos de su colega Jakob. Por su parte, Jakob alegaba que, aunque no se detectó espongiosis *post mortem* en el caso descrito por Creutzfeldt, las neuropatías descritas por ambos eran idénticas o estaban estrechamente relacionadas (2). Todo esto ha llevado a algunos autores a sugerir la conveniencia de renombrar esta afección como enfermedad de Jakob-Creutzfeldt o incluso enfermedad de Jakob, propuesta no aceptada por lo extendido del epónimo original (15). Como anécdota, el microbiólogo y

INTRODUCCIÓN

bromista empedernido Clarence Joseph Gibbs Jr., de cuya contribución a la investigación de las TSE se hablará más adelante, abogaba a favor de las siglas CJD por la coincidencia con sus propias iniciales, como si de la enfermedad de Clarence Joseph (en inglés, *Clarence Joseph disease, CJD*) se tratara, contribuyendo accidental o deliberadamente al reconocimiento de este epónimo (16). A esta peculiar polémica sobre la autoría del primer caso documentado de lo que más adelante se conocerían como encefalopatías espongiformes transmisibles humanas, hay que añadir la consideración hecha por Spillane en 1981. Este neurólogo galés reivindicaba que la esclerosis miliar descrita por Gowers en 1888, una encefalopatía de rápida evolución con signos clínicos semejantes a los descritos por Creutzfeldt y Jakob años más tarde, sería el primer caso documentado de lo que hoy conocemos como CJD (Spillane. *The doctrine of the nerves. Chapters in the history of neurology*. Oxford: Oxford University Press, 1981). Sea como fuere y dado lo heterogéneo de los signos clínicos de estas neuropatías, no sería hasta años más tarde que la descripción de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob se correspondería con la TSE que conocemos hoy en día.

Otra prionopatía descrita en esta época que, aunque carente de polémica en torno a ella, tampoco sería considerada como tal hasta tiempo después, fue la definida por en 1936 Josef Gerstmann, Ernst Sträussler y Ilya Mark Scheinker. Recibiendo el nombre de los expertos que la caracterizaron, el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) fue descrito como demencia progresiva y caracterizada por ataxia cerebelosa observada en una familia de la cual varios miembros habían fallecido a causa de esta enfermedad (17, 18).

Sin embargo, no fue hasta años más tarde cuando se define por vez primera el concepto de encefalopatía espongiforme transmisible y se sienta el precedente de lo que hoy entendemos como tal, dándose el primer paso para la determinación de su agente causal. La historia de este gran avance en el campo de las prionopatías empezó en 1956, cuando Vincent Zigas, oficial médico de origen estonio, se encontraba trabajando en el entonces territorio australiano de Nueva Guinea (hoy Papúa Nueva Guinea). Fue en aquí donde Zigas inició la investigación de una extraña enfermedad neurodegenerativa sin precedente, caracterizada por una ataxia cerebelar y una progresiva disfunción motora, de naturaleza epidémica entre los nativos de la tribu de los Fore (2). Las personas afectadas por esta enfermedad padecían violentos temblores y estremecimientos, lo que le valió el nombre de *kuru*, palabra que en el lenguaje de los Fore significa “temblar de frío o fiebre”. La rápida progresión del *kuru* y la velocidad con la que causaba la muerte de los miembros de la tribu le brindó a esta enfermedad un origen místico entre los Fore, asociándola con brujería y maldiciones. Otro rasgo característico de esta “maldición” es que

INTRODUCCIÓN

parecía ensañarse con mujeres y niños, los más afectados (19). No obstante, antes de ser conscientes de la gravedad de la enfermedad y asociarlo con la brujería, los Fore se referían a este mal como *negi nagi*, lo que en su lenguaje significa “persona tonta o estúpida”. La razón de esta terminología radica en que, en los primeros estadios de la enfermedad, los afectados padecían cambios emocionales inexplicables para los miembros de la tribu, que iban desde la depresión hasta la euforia, siendo frecuentes los ataques de risa compulsiva. Estos ataques de risa, junto con un característico rictus facial en forma de sonrisa, hizo que el kuru fuese posteriormente bautizado como “muerte de la risa” o “muerte sonriente” (en inglés, *laughing death*) por los medios (19).

El misterio que rodeaba a esta nueva enfermedad hizo que el médico estadounidense Daniel Carleton Gajdusek, quien en ese momento se encontraba en Australia, se interesase por ella y visitara a Zigas en su campamento médico en Nueva Guinea en marzo de 1957. Allí, Gajdusek tuvo la oportunidad de conocer y examinar a algunas de las víctimas del *kuru*, momento en el que comenzaría una colaboración entre ambos especialistas con el objetivo de estudiar a fondo esta enfermedad (2). Los primeros frutos de esta colaboración no se hicieron esperar, ya que en septiembre de 1957 publicaron una descripción clínica de 114 casos de *kuru* en los que incluyeron los rasgos característicos ya referidos, así como los hallazgos *post mortem* de seis autopsias, resaltando la degeneración neuronal observada, más intensa en el cerebelo y el sistema extrapiramidal (20, 21). Aunque en un principio se barajó la posibilidad de una etiología genética o incluso mediada por un tóxico en detrimento de una de carácter infeccioso, los estudios sobre el recorrido geográfico y evolución del *kuru* desde su origen a principios de siglo XX, de acuerdo con los testimonios de los Fore, llevaron a Gajdusek a establecer una nueva relación de causalidad: las prácticas de endocanibalismo presentes en los ritos funerarios (19, 22, 23). En estos ritos, la esposa e hijos del familiar fallecido consumían su cadáver, provocando así la transmisión del *kuru*, lo que daba una explicación a la mayor incidencia de la enfermedad en mujeres y niños. Esta hipótesis estaba respaldada también por otros hechos como la aparición de los signos clínicos en hermanos en edades similares (punto común de contagio), la ausencia de casos de *kuru* entre niños nacidos a partir de 1954 (las prácticas endocanibalistas cesaron a principio de la década de 1950) y la ausencia de la enfermedad entre otras tribus cercanas, como la de los Anga, que no compartían estos ritos funerarios (7, 19). Este conjunto de hallazgos llevó a Gajdusek a teorizar que el agente causal del *kuru* era un “virus lento” presente en el organismo de los fallecidos, más concretamente en el tejido nervioso, que era transmitido en estas prácticas funerarias.

INTRODUCCIÓN

La conclusión de que este “virus lento” se localizaba principalmente en el tejido nervioso se debió a los estudios histopatológicos *post mortem* de los afectados y su degeneración neuronal (*vide supra*) llevadas a cabo por Gajdusek y Zigas. Las preparaciones resultantes de estos estudios llegaron a manos del neuropatólogo polaco Igor Klatzo, quien fue el primero en establecer una relación de semejanza entre las muestras de afectados por *kuru* y las de afectados por la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (22). Klatzo fue más allá en el análisis de estas muestras, describiendo una proliferación e hipertrofia de células gliales y unas estructuras con forma de placa, tanto en el cerebelo como en los ganglios basales y el córtex, las cuales tendrán una importancia vital en las TSE (22).

El siguiente gran avance dentro de las TSE resultó de una serie de eventos fortuitos. La tembladera, aquella enfermedad ovina de agente causal desconocido endémica en el Reino Unido desde que pareciera en el siglo XVIII, había empezado a extenderse lentamente por Estados Unidos y Canadá durante el siglo XX (24). Esto llevó al Departamento de Agricultura de los Estados Unidos a enviar en 1958 al patólogo veterinario William Hadlow al *UK Agricultural Research Council Field Station* en Compton, Inglaterra, para aprender más sobre esta enfermedad. Desde allí, y por recomendación del parasitólogo americano William Jellison, Hadlow visitó el *Wellcome Medical Museum* de Londres, donde Gajdusek había organizado una exposición sobre la enfermedad del *kuru* (2). Fue en esta exposición donde Hadlow tuvo acceso a los estudios llevados a cabo por Klatzo, observando similitudes entre la histopatología del *kuru* y de la tembladera. En ambos casos, los cerebros afectados presentaban característicos cambios espongiiformes en la materia gris, degeneración neuronal y astrogliosis. Estas semejanzas llevaron a Hadlow a revisar lo publicado sobre el *kuru* y a compartir con Gajdusek sus observaciones sobre las semejanzas entre la tembladera y esta enfermedad en lo concerniente a las características epidemiológicas, el patrón clínico general y los cambios neurohistológicos (25). No obstante, la aportación de Hadlow al estudio de las TSE no acabó ahí, sino que sugirió a Gajdusek la posibilidad de que el *kuru* compartiese el carácter transmisible de la tembladera (24). De este modo, al igual que la tembladera se transmite mediante la inoculación de tejido nervioso en ovejas sanas, el *kuru* podría comportarse de manera semejante al inocularse en primates superiores. Así, en 1963 Gajdusek, junto al estadounidense C. J. Gibbs Jr. y al australiano Michael P. Alpers, inoculó cerebros de pacientes fallecidos a causa del *kuru* en chimpancés, los cuales enfermaron en menos de tres años. Estos animales manifestaron una enfermedad neurológica progresiva y, en el examen histopatológico *post mortem* llevado a cabo en sus cerebros, los ya conocidos cambios espongiiformes en la materia gris, degeneración neuronal y astrogliosis (26). Además de chimpancés, otros primates como monos araña y monos tití fueron inoculados, todos ellos enfermando y presentando los rasgos típicos de la enfermedad (27, 28). Así, la teoría del

INTRODUCCIÓN

endocanibalismo ritual como fuente de contagio del *kuru* entre los Fore y el carácter transmisible de su agente causal quedaron completamente confirmados. Animados por estos resultados y basándose en la relación de semejanza entre el *kuru* y la CJD hecha por Klatzo años antes, el equipo de Gajdusek, Gibbs y Alpers inoculó un chimpancé con homogeneizado de cerebro procedente de un paciente fallecido a causa de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob. Los primeros signos clínicos aparecieron en el animal trece meses después de la inoculación (29). El estudio histopatológico *post mortem* del cerebro reveló la característica neurodegeneración espongiiforme observada tanto en el *kuru* como en la tembladera, de manera que se demostró la naturaleza común de estas tres enfermedades, quedando definidas como encefalopatías espongiiformes transmisibles. El conjunto de los hallazgos y méritos descritos con respecto a las TSE en general y el *kuru* en particular hicieron ganador del Premio Nobel de Medicina a Daniel Carleton Gajdusek en 1976.

Recientemente, gracias a un estudio comparativo utilizando técnicas de imagen modernas y simulación tridimensional, ha sido posible llegar un paso más allá en la descripción del *kuru*, caracterizando las placas observadas en cerebros de pacientes con esta enfermedad y relacionándolas con las observadas en pacientes con GSS. De este modo, los polacos Beata Sikorska y Pawel Liberski han propuesto un caso de GSS, posteriormente transmitido entre miembros de la tribu Fore, como posible origen del *kuru* (Multi-centric plaques in *kuru*: a fingerprint of its origin; Beata Sikorska and Pawel P. Liberski, poster Prion2022).

Volviendo a la naturaleza transmisible de la CJD, su descubrimiento supuso la revisión de casos de enfermedad de Creutzfeldt-Jakob sospechosos de haber sido contraídos por contagio asociado al uso de material quirúrgico contaminado (30). No obstante, el primer caso reconocido y documentado de CJD iatrogénica data de 1974, siendo el medio de contagio un trasplante de córnea procedente de un donante no diagnosticado (31). Aunque en los años siguientes se confirmaron dos casos más de CJD iatrogénica derivada de trasplantes de córnea y se sospecha que esta sea la causa de otros tres casos más (32), el mayor número de este tipo de contagios son los relacionados con injertos de duramadre y tratamientos con hormona de crecimiento derivadas de glándulas pituitarias humanas extraídas de cadáveres (2). Otro importante descubrimiento relacionado con el carácter transmisible de las TSE fue la posibilidad de contagio por transfusión de sangre, tal y como describió Manuelidis en 1978 con conejillos de india y CJD experimental y fue confirmado por numerosos experimentos incluyendo diferentes especies animales y diferentes prionopatías, desde el GSS hasta la tembladera (33-35). Aunque los largos tiempos de incubación en los modelos animales desde la transfusión hasta el inicio de la enfermedad demostró que

INTRODUCCIÓN

la cantidad de agente infeccioso en sangre debía de ser muy pequeña, esto no impidió que se dieran casos de contagios en humanos. El primero de estos casos en ser registrado, en el que el paciente acabaría desarrollando la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (de la que se hablará más adelante), tuvo lugar en 2003 en Reino Unido (36).

La caracterización cada vez más completa de las encefalopatías espongiformes transmisibles hizo posible que en los años posteriores otras neuropatías poco frecuentes pudiesen ser englobadas en este grupo tras su descripción. Este fue el caso del insomnio familiar letal (FFI), descrito por el neurólogo Elio Lugaresi en 1986 en un paciente de una familia italiana en la que varios miembros de la misma padecían la misma enfermedad neurológica (37). Esta enfermedad se caracterizaba por una serie de cambios en el tálamo que desembocaban en ataxia progresiva, disautonomía e insomnio, el cual le da nombre a esta enfermedad (38). Aunque algunos de los signos clínicos de esta enfermedad coinciden con los de la CJD, los cambios observados en el tálamo, así como el característico insomnio y la incapacidad de transmitir el FFI a primates no humanos permitieron su diferenciación dentro de las TSE y su correcto diagnóstico (39). La última de las TSE descritas en humanos es la prionopatía con sensibilidad variable a proteasas (VPSPr), cuyo primer caso reportado data de 2008 (40). Esta enfermedad, de la que sólo se han reportado 37 casos en total, presenta unas características histopatológicas propias y unos signos clínicos heterogéneos que la diferencian de otras TSE, pero su rasgo más característico es su relación con una isoforma patogénica de la proteína priónica no resistente a proteasas (41). Sin embargo, desde el descubrimiento de la transmisibilidad de las TSE por parte de Gajdusek y colaboradores en 1968 hasta que se estableció una relación entre estas encefalopatías y la proteína priónica aún habrían de pasar años.

1.1.3.- Desentrañando el arcano de las encefalopatías espongiformes transmisibles: el agente causal

Si bien el primero en considerar la posibilidad de que una TSE como es la tembladera estuviera causada por algún tipo de virus fue Besnoit en 1899, los primeros experimentos en apoyar esa teoría fueron los de Cuillé y Chelle en 1936, los cuales contaron con el respaldo de los estudios de Gordon en 1938 y Wilson en 1950, tal y como se ha explicado previamente (7). No obstante, fue en 1954 cuando el microbiólogo islandés Björn Sigurdsson describió el concepto de infección “lenta”. Este concepto hacía referencia a cualquier infección, independientemente del agente causal, que comparte características tales como un período de incubación largo, de meses o años, un curso prolongado de enfermedad, un desarrollo invariablemente letal, una patología restringida a un solo órgano o sistema y un rango de especies susceptibles limitado. De este modo, Sigurdsson incluyó en este grupo una encefalitis ovina denominada *rida* en Islandia que podría haberse tratado, al menos en algunos casos, de tembladera (2).

INTRODUCCIÓN

Así, aunque considerada una infección “lenta”, la posibilidad de una naturaleza vírica para su agente causal se enfrentaba a numerosas evidencias en contra, como sus ya citadas resistencias a la formalina, a las altas temperaturas o a radiaciones ionizantes (9-11). Años más tarde, en 1964, I. H. Pattison y B. F. Sansom fueron capaces de mantener el agente infeccioso de la tembladera incluso después de someterlo a filtrados utilizando membranas de diálisis con un tamaño de poro de 2,4 μm , es decir, unas diez veces más pequeño que el utilizado para retener virus de tamaños medianos y pequeños (tamaño de poro de 20-35 μm) (42).

De forma paralela a estos experimentos, también Pattison, en esta ocasión en colaboración con Millson, transmitió la tembladera de ovejas a cabras, siendo esta la primera vez que se observaba la aparición de cepas claramente diferenciadas: parte de las cabras inoculadas presentaron un comportamiento de rascado (*scratching*, en inglés) al desarrollar la enfermedad, mientras que otras de las cabras inoculadas manifestaban la tembladera en forma de un aletargamiento general (*drowsy*, en inglés) (43). Además, al inocular el mismo aislado de tembladera a cabras y diferentes razas de ovejas, observaron distintos grados de susceptibilidad a la enfermedad. De nuevo, estos datos parecían respaldar la hipótesis del virus como causante de la tembladera al apuntar a la existencia de material genético en el agente infeccioso, siendo este susceptible de sufrir cambios que resultasen en cepas con infectividad y propiedades diferentes (44). La existencia de nuevas cepas se tradujo en nuevas posibilidades de conocer más sobre esta enfermedad y su agente causal, lo que llevó a la transmisibilidad de las cepas *drowsy* y *scratching* de la tembladera caprina a ratones tipo silvestre (wt, del inglés, *wild type*) por parte del británico R. L. Chandler (45). El éxito cosechado por Chandler llevó en años posteriores a la demostración de la capacidad de transmisión de la tembladera ovina original a especies como ratones WT y ratas (46, 47). Este conjunto de evidencias, tanto a favor como en contra de la hipótesis de la etiología vírica de la tembladera, llevó a Pattison a especular en 1965 que, si realmente se trataba de un virus, el agente causal de la tembladera sería un tipo de virus inédito (48).

Con estos precedentes, tras establecer una relación entre la tembladera, el *kuru* y la CJD gracias a Klatzo y Hadlow y demostrar la transmisibilidad las últimas a primates utilizando material infeccioso filtrado, Gajdusek y Gibbs hipotetizaron en 1967 que el agente causal de estas enfermedades sería un “virus lento”, proponiendo el término encefalopatía viral espongiforme subaguda para este grupo de neuropatías (22, 25, 26, 49). Sin embargo, fue en ese mismo año cuando se propuso una nueva idea que no sólo iba contra la teoría del “virus lento” como agente causal de las TSE, sino contra el dogma central de la biología molecular. Esta idea comenzó a gestarse cuando la física sudafricana Tikvah Alper estudió

INTRODUCCIÓN

la resistencia del agente de la tembladera a la inactivación por radiación ionizante y luz ultravioleta (50, 51). Esta inusual resistencia a la irradiación llevó a Alper a sugerir a principios de 1967 que la presencia de material genético en el agente de la tembladera debía ser demasiado pequeña o incluso nula como para que se tratara de un virus, insinuando que incluso podría tratarse de una proteína. Unos meses más tarde Pattison y Jones coincidieron con la opinión de Alper al insinuar en una monografía sobre la tembladera que su agente causal podría ser una proteína o al menos estar íntimamente asociado a ella (52). En septiembre de este año, Gibbons y Hunter revisan los resultados de los experimentos realizados alrededor del agente de la tembladera, analizando las evidencias a favor y en contra de las diferentes hipótesis contempladas hasta entonces: la hipótesis del virus, la hipótesis de la proteína, la hipótesis carbohidrato (asociado o no a proteína) y la hipótesis de la membrana con capacidad autorreplicativa (53). Sin embargo, el mayor apoyo a la teoría de la proteína como agente causal de la tembladera con respecto al resto de hipótesis se recoge en un artículo publicado asociado al de Gibbons y Hunter. En este artículo, el químico y matemático John Stanley Griffith describe tres mecanismos teóricos por lo que una proteína podría presentar capacidad autorreplicativa e inducir la enfermedad en un organismo. El segundo de los mecanismos de Griffith se basa en la existencia de una proteína con dos posibles conformaciones, una reactiva y con tendencia a polimerizar, α , y otra estable y presente de forma normal en el organismo, α' . De esta manera, cuando la forma reactiva α entra en contacto con la forma estable α' , esta última sufre un cambio en su conformación volviéndose reactiva y uniéndose a la primera, formando dímeros, trímeros, etc. Así, el autor explica el carácter transmisible de la tembladera. Además, Griffith describe también la posibilidad, si bien escasa por lo termodinámicamente desfavorable del evento, de que una o varias proteínas del tipo α' cambien su conformación a α iniciando el proceso de polimerización y dando una explicación a los casos de tembladera de aparición espontánea (54).

1.1.3.1- Formulando la hipótesis “solo proteína”

El conjunto de pruebas a favor de la naturaleza proteica del agente infeccioso de las TSE junto con la brillante propuesta de Griffith llevaron a un punto de inflexión en la historia y el estudio de estas enfermedades de la mano del neurólogo estadounidense Stanley B. Prusiner, el cual sería galardonado con el Premio Nobel en Medicina en 1997 en reconocimiento a sus estudios en este campo. Este punto de inflexión no es otro que el descubrimiento del agente causal de las encefalopatías espongiformes transmisibles y, con ello, la descripción de un nuevo tipo de patógeno.

Para esto, Prusiner se centró en el estudio del agente causal enfocándolo desde la perspectiva de que su naturaleza era la de esas proteínas teorizadas por Griffith, de manera que sometió aislados de

INTRODUCCIÓN

tembladera a métodos de inactivación de proteínas tales como su exposición a fenol, hidrocloreuro de guanidinio, urea y varios detergentes, observando cómo la infectividad de estas muestras se reducía o desaparecía completamente (55-57). Si bien estudios de este tipo ya habían sido llevados a cabo con anterioridad, como aquel desarrollado por Hunter y Millson en 1967 en el que sometían muestras de tembladera a digestiones proteolíticas con proteinasa K (PK) y tripsina o el experimento de H. J. Cho de 1980 en el que comparaba la infectividad de un aislado de tembladera tras tratarlo con RNasa A, DNasa I y pronasa, observándose en ambos estudios una inactivación total o parcial tras el tratamiento proteolítico, lo que diferenció a Prusiner del resto fue su capacidad para extraer conclusiones más categóricas (58, 59). Mientras que el resto se limitaba a relacionar estos datos con un agente causal estrechamente relacionado y dependiente de una proteína, Prusiner propuso en 1982 la hipótesis “solo proteína”, según la cual esta era el agente causal, aportando datos experimentales al modelo teórico de Griffith y acuñando el término “prion” (del inglés, *proteinaceous infectious particle*) para referirse a dicha proteína (60).

De forma simultánea a esta propuesta otro importante estudio se fraguaba en manos de David Bolton y Michael McKinley, colaboradores de Prusiner, quienes aislaron una proteína de cerebros de hámsteres infectados con tembladera. Esta proteína, que no se encontraba en los cerebros de hámsteres sanos, presentaba una serie de características particulares como una resistencia parcial al tratamiento con proteasas y un tamaño de 27-30 kDa (61). Las peculiares estructuras observadas por microscopía fueron bautizadas por Prusiner como “varillas priónicas” (en inglés, *prion rods*) y se les atribuyó una naturaleza amiloidea relacionándolas con los agregados presentes en cerebros de afectados por TSE (Figura 2). Además, Prusiner señalaría a la proteína del prion (PrP, del inglés, *prion protein*) como componente mayoritario, si no único, de los priones y a la fracción de 27-30 kDa de esta proteína (PrP²⁷⁻³⁰) como la fracción infecciosa (62).

Paralelamente a los estudios y propuestas de Prusiner y colaboradores, cabe destacar a Patricia A. Merz y su grupo, quienes fueron los primeros en observar las estructuras fibrilares presentes en cerebros de roedores infectados con tembladera mediante la técnica de microscopía electrónica de tinción negativa en 1981 (63). Merz detectaría estas mismas estructuras en cerebros de pacientes de CJD y kuru, relacionándolas con el posible agente causal no sólo de la tembladera, si no de todas las TSE (64). Sin embargo, y como ejemplo para ilustrar la reticencia mostrada por la comunidad científica a la audaz propuesta de Prusiner de un agente infeccioso inédito, el prion, compuesto únicamente por proteína,

INTRODUCCIÓN

Merz y colaboradores nombraron a estas estructuras “virus filamentosos”, decantándose por las hipótesis más conservadoras de la naturaleza vírica del agente causal de las TSE.

No obstante, el grupo de Prusiner continuó desarrollando su enfoque, aislando la secuencia de los últimos 15 aminoácidos del extremo amino terminal de PrP a partir de homo

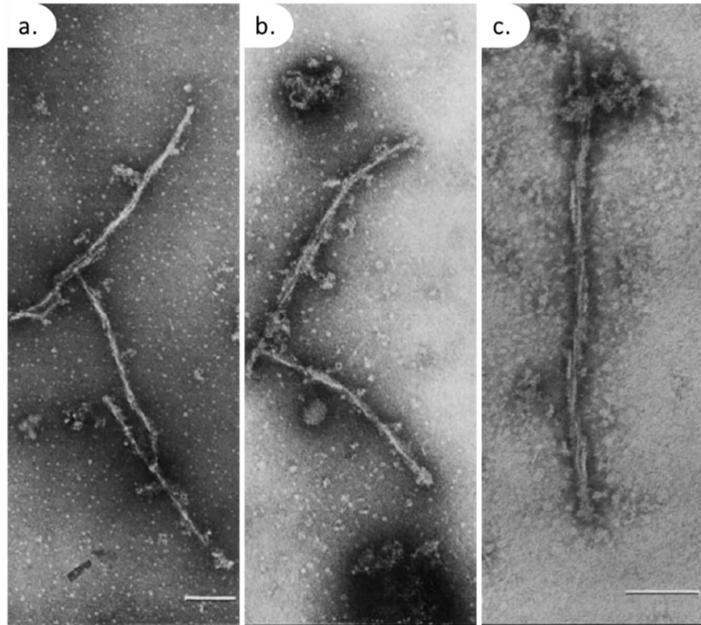


Figura 2. Imágenes de microscopía electrónica de fibras de PrP asociadas a EET. a) Microfotografía de campo oscuro teñida con ácido fosfotúngstico que muestra las denominadas “varillas priónicas” constituidas por PrP^{Sc} y purificadas a partir de un cerebro de hámster infectado con CJD; **b)** de un cerebro humano afectado de CJD y **c)** de un cerebro de ratón infectado con la cepa de scrapie 139A. Barra de escala de 0.1 μm . Modificado de Mertz et al. 1983.

geneizado de cerebros de hámsteres infectados con tembladera (65). Gracias a esto, Bruce W. Chesebro y su grupo pudieron aislar y secuenciar el ARN mensajero (mRNA, del inglés, *messenger ribonucleic acid*) que codificaba la PrP²⁷⁻³⁰. Para su sorpresa, encontraron este mRNA tanto en animales sanos como en infectados por TSE, lo que parecía indicar que esta proteína se encontraba en el cerebro de ratones de forma natural (66). De forma paralela a este descubrimiento, Bruno Oesch y colaboradores identificaron un gen de copia única que codificaba esta proteína, presente también tanto en hámsteres sanos como enfermos. Este grupo de investigadores descubrieron que el producto de dicho gen era una PrP de 33-35 kDa, de la que derivaba la PrP²⁷⁻³⁰, y que, mientras que la proteína presente en animales enfermos era resistente a la digestión con PK, la encontrada en animales sanos era susceptible a este tratamiento (67). Esta serie de estudios alcanzaron su cenit en 1986, cuando el afamado biólogo molecular Charles

INTRODUCCIÓN

Weissmann y su grupo llevaron a cabo la clonación del gen que codifica la PrP, al que llamaron *PRNP*, el cual se expresaba de forma constitutiva tanto en neuronas de animales sanos como en otros tipos celulares, apuntando a una expresión ubicua del mismo (68, 69).

De este modo, se comenzaba a esbozar la solución al rompecabezas del agente causal de las TSE, apuntando a la isoforma de menor peso molecular de la proteína priónica, la PrP²⁷⁻³⁰ o PrP^{Sc} (por su asociación con la tembladera o *scrapie*, en inglés), como responsable de la enfermedad y a la de mayor peso molecular, conocida como PrP^C (proteína priónica celular) como la isoforma presente en individuos sanos, estando ambas isoformas codificadas en el mismo gen, el *PRNP*.

1.1.3.2.- Confirmando la hipótesis “solo proteína”

Aunque numerosos descubrimientos que parecían respaldar la teoría del prion como agente causal, lo novedoso y rompedor del enfoque de una proteína como único elemento patógeno capaz de replicarse y transmitir información específica dando lugar a diferentes cepas, todo ello sin necesidad de material genético (una propuesta “claramente herética”, en palabras atribuidas al propio Prusiner) seguía sin ser completamente aceptado entre la comunidad científica. Esto dio pie al desarrollo de una hipótesis, la del virino, presentada por primera vez por Dickinson y Outram en 1979 (70). Según esta teoría, el virino sería el agente causal de las TSE, estando este compuesto por una cantidad muy pequeña de material genético el cual se une de forma específica a proteínas presentes en las células del individuo infectado, quedando así protegido por ellas, y que es capaz de utilizar los mecanismos de la célula infectada para su propia replicación, produciendo una variante u otra de la enfermedad (y explicando así la posibilidad de diferentes cepas) en función de cada individuo (71). Sin embargo, esta teoría, junto a las referentes a “virus lentos”, acabarían siendo desestimadas, ya que las evidencias que finalmente demostrarían la hipótesis “solo proteína” de Prusiner no se hicieron esperar.

- **Evidencias bioquímicas y biológicas**

Las primeras evidencias que respaldan la hipótesis “solo proteína”, si bien de forma aparentemente subrepticia, se remontan a la década de 1920, cuando se empezaron a registrar datos que vinculaban enfermedades como la CJD con la herencia genética. En los años posteriores, surgieron otras evidencias basadas en experimentos con animales que, aunque en un principio parecían dar mayor veracidad a la teoría del “virus lento” que a la de “solo proteína”, una reinterpretación ulterior ponía de manifiesto la importancia tanto de la dotación genética del agente causal como a la del huésped. Este es el caso de los ya citados experimentos de Pattison y Millson en 1961, cuando describieron por primera

INTRODUCCIÓN

vez cepas diferentes de tembladera al inocular cabras con homogeneizados de cerebro de ovejas con esta enfermedad, sentando las bases de lo que hoy conocemos como fenómeno de cepas priónicas y barrera de transmisión (43). Fue también en la década de 1960 cuando el grupo de A. G. Dickinson demostró que, tras inocular tembladera en ratones, el período de incubación hasta la manifestación de la enfermedad dependía de un *locus* cromosómico, al que llamaron *Sinc* (del inglés, *scrapie incubation*), que también localizaron en ovejas, denominándolo *SIP* (del inglés, *Shorter Incubation Period*) debido al menor tiempo de incubación en esta especie (72, 73). Basándose en estos estudios, el grupo de Prusiner aisló en 1986 el *locus* que contenía el gen que codifica la PrP^C, al que llamaron *Prn-p*, y definieron su estrecha relación con el *locus Sinc*, al que denominaron *Prn-i* (69). Finalmente, mediante un experimento en el que introducían cambios o polimorfismos en estos *loci* para estudiar su efecto en el tiempo de incubación de la tembladera en ratones, el grupo de Prusiner demostró en 1998 que tanto *Prn-p* como *Prn-i* no eran sino alelos de un mismo gen, el *PRNP*, que codifica la PrP (74). De esta manera, este viaje de 70 años centrado en la genética de las TSE iba definiendo poco a poco la importancia de un solo gen, el PRNP, y de la PrP como único responsable de la enfermedad. Sin embargo, la culminación de este viaje no llegó únicamente con la vinculación del gen *PRNP* con las TSE, si no de mutaciones puntuales en dicho gen con diferentes enfermedades de este tipo, definiéndose así las formas familiares o genéticas de la enfermedad. Algunas de las más destacadas son la relación entre la mutación P102L y el GSS (75), el descubrimiento de que las inserciones de una zona de repeticiones de octapéptidos causaban una forma familiar o hereditaria de CJD (fCJD, del inglés, *familial Creutzfeldt-Jakob Disease*) (76) o la relación entre la mutación D178N y el FFI (77).

De forma paralela a estos estudios genéticos, se han ido sucediendo numerosos estudios que han dado validez a la hipótesis “solo proteína”, incluso antes de que esta fuese formulada. Este es el caso, ente otros, de los experimentos de Alper ya mencionados, en los que demostraba la resistencia del agente causal a métodos de inactivación de ácidos nucleicos, o los de Hunter y Millson, con los que describieron la sensibilidad de dicho agente a proteasas (50, 51, 58). Años después, estos datos llevarían a Prusiner a establecer una relación de proporcionalidad entre la fracción resistente a proteasas del agente infeccioso, ya definido como prion, con la infectividad (60).

El siguiente punto importante en la demostración bioquímica de la hipótesis “solo proteína” se debe al intento de explicar la diferencia entre la PrP^C y la PrP^{Sc} y, por tanto, la capacidad patogénica de la segunda. Una de las primeras explicaciones propuestas vino de la mano de Prusiner y colaboradores, atribuyendo estas diferencias a modificaciones post-traduccionales. De este modo, se detectó una

INTRODUCCIÓN

modificación post-traducciona que se daba tanto en la PrP^C como en la PrP^{Sc} y, por tanto, no podía explicar el carácter patogénico de la isoforma pícara. Esta modificación consistía en la presencia de un glicolípido (fosfatidil-inositol), cuya función es el anclaje de la proteína priónica a la membrana celular (78). Años más tarde, el mismo grupo concluyó que ambas formas de la proteína poseían idénticas secuencias aminoacídicas y modificaciones post-traduccionales, sugiriendo que las diferencias se limitaban al nivel estructural (79). La naturaleza insoluble de la PrP^{Sc}, así como su incapacidad para formar cristales, dificultó el esclarecimiento de su estructura debido a las limitaciones técnicas de las estrategias disponibles para tal fin, como el dicróismo circular (DC, del inglés, *Circular Dichroism*) o la cristalografía. No obstante, el grupo de Byron Caughey, utilizando la técnica del dicróismo circular con la espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR, del inglés, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) y basándose en el algoritmo de Garnier, pudo realizar un estudio preliminar de la estructura secundaria de agregados de PrP resistentes a PK (80). Esto permitió un mejor modelaje de las estructuras secundarias que adoptaban ambas formas de la proteína, mostrando una disminución en el contenido de hélices- α en favor de un aumento en la proporción de láminas- β (81). La lámina- β u hoja plegada β es una de las posibles estructuras secundarias que puede adoptar una proteína y se caracteriza por su naturaleza hidrofóbica y su tendencia a formar oligómeros, explicando algunas de las propiedades de la PrP^{Sc} como su insolubilidad en detergentes no iónicos (82). Además del aumento de láminas- β en su estructura, la identificación de un segmento no ordenado correspondiente a los primeros 90 aminoácidos de la proteína arrojó luz sobre otra de las características de la PrP^{Sc}: su diferencia de tamaño con respecto a la isoforma celular. Esto se debe a una resistencia parcial a la digestión por proteasas, como la proteinasa K, capaz de digerir el segmento no ordenado, pero no la región de la proteína rica en láminas- β . De esta manera, como producto de la digestión con PK se obtiene una proteína de 27-30 kDa, siendo aquella denominada como PrP²⁷⁻³⁰ (83). Otra de las características otorgadas por una estructura secundaria rica en láminas- β es la tendencia de la PrP^{Sc} a agregarse, formando las placas y fibras amiloideas observadas en cerebros de pacientes con TSE (84). A día de hoy, esa isoforma resistente a la digestión con proteasas que puede ser detectada por técnicas analíticas como el *Western blot*, así como las fibras de PrP^{Sc} detectables mediante técnicas inmunohistoquímicas, constituyen el principal marcador patognomónico de las TSE.

- **Evidencias derivadas de estudios en animales**

Los primeros estudios de TSE con animales fueron aquellos que se centraron en demostrar el carácter transmisible del agente causal mediante la inoculación del mismo en las mismas especies en las que describió la enfermedad o en especies cercanas, como el caso de la transmisión de la tembladera a

INTRODUCCIÓN

ovejas y cabras o del kuru a primates no humanos (8, 26, 43). No obstante, fue Chandler en 1961 quien dio un paso decisivo en la investigación de las enfermedades priónicas en modelos animales al transmitir con éxito aislados de tembladera a ratones wt. De este modo, además de facilitar un modelo animal más accesible y asequible, permitió el estudio de diferentes tiempos de incubación en función del asilado de tembladera utilizado, allanando así el camino a un nuevo paradigma en la diferenciación de cepas, y la presencia de una barrera de transmisión para diferentes tipos de roedores (45). Este modelo demostró su versatilidad en los años posteriores cuando fue experimentalmente infectado con éxito con otras TSE, como la CJD y la BSE (85, 86). Otro modelo animal ampliamente utilizado en la década de 1980 para el estudio de las enfermedades priónicas fue el hámster sirio dorado, destacando los experimentos de Kimberlin y Walker centrados en la caracterización de cepas de tembladera (87-89). Si bien los datos arrojados por los estudios con ratones wt y hámsteres ponían de manifiesto la importancia del genotipo del huésped en las TSE, la imposibilidad o dificultad a la hora de trabajar con otros modelos animales y, por tanto, con genotipos diferentes, supuso una limitación en el avance de la comprensión de estas enfermedades.

Sin embargo, la solución a este problema no se hizo esperar: en 1982 Richard D. Palmiter y Ralph L. Brinster desarrollaron el primer ratón transgénico (90). Si bien nada tenía que ver con las TSE (este primer ratón transgénico, capaz de desarrollar tumores cerebrales y linfoides, había sido diseñado como modelo para el tratamiento de los mismos), los estudios de Palmiter y Brinster abrieron la veda para el desarrollo de nuevos ratones transgénicos y el amplio abanico de posibilidades que ello implicaba. Fue solamente siete años después, en 1989 cuando Michael Scott y colaboradores publicaron los primeros datos sobre la generación de un ratón transgénico que expresaba la PrP^C del hámster sirio dorado y que, al ser inoculado con tembladera, era capaz de reproducir los rasgos fenotípicos específicos que dicha enfermedad producía esta especie (91). A partir de este momento, el diseño y generación de nuevos ratones transgénicos expresando la PrP^C de diferentes especies supondría un avance fundamental para la determinación y comprensión del agente infeccioso.

Así, se sucederían importantes progresos en el estudio de los priones, como aquel en el que la generación de un modelo animal con la mutación puntual en el gen *PRNP* para que expresase una PrP^C con el polimorfismo P102L, asociado al GSS, demostró que un cambio puntual en este gen es suficiente para la aparición espontánea de esta enfermedad, respaldando la hipótesis “solo proteína” (92). Sin embargo, tiempo después se descubrió que la enfermedad generada en estos ratones no era exactamente GSS, ya que, a pesar de producir los mismos signos clínicos, no era posible su transmisión a otros animales

INTRODUCCIÓN

(93). No obstante, en los años posteriores se fueron generando animales transgénicos que sí mimetizaban todos los aspectos típicos de las TSE, desde su aparición espontánea en ciertos modelos hasta el fenotipo típico de cada enfermedad, permitiendo la transmisibilidad de las mismas. Algunos ejemplos son el modelo de ratón transgénico que expresa la PrP^C bovina con una mutación asociada a GSS en humanos (94), los ratones transgénicos que expresan PrP^C de ratón con mutaciones asociadas a GSS y CJD (95) o el modelo de ratón transgénico que expresa la PrP^C del topillo rojo, cuyo polimorfismo natural 109I favorece el malplegamiento espontáneo (96).

En la década de 1990 se desarrollaron una serie de modelos animales transgénicos que, ahondando en el mismo concepto, supusieron una evidencia decisiva a favor de la hipótesis “solo proteína”. Estos fueron aquellos modelos en los que se modificaba la cantidad de PrP^C expresada, generándose modelos en los que se eliminó el gen *PRNP* (*PRNP*^{-/-}), de manera que no expresaban PrP^C alguna, modelos hemicigotos para para este gen (*PRNP*^{+/-}), es decir, que expresaban la mitad de PrP^C que un ratón wt (*PRNP*^{+/+}), y modelos que sobreexpresaban el gen *PRNP*, aumentando la cantidad de PrP^C presente en el animal. Así se descubrió que los animales sin PrP^C eran completamente resistentes a la infección con tembladera, demostrando que esta proteína es indispensable para la propagación y acumulación de PrP^{Sc} (97). En el caso de los ratones hemicigotos, se observó que los niveles de PrP^C están directamente relacionados con los tiempos de incubación de la enfermedad y la tasa de formación y acumulación de PrP^{Sc}, retrasando la aparición de los signos clínicos de la tembladera y reduciendo la cantidad de PrP^{Sc} presente en el cerebro de estos animales (98). Finalmente, la sobreexpresión del gen *PRNP* confirmó estos datos al aportar datos consecuentes con lo anterior: una mayor expresión de PrP^C se traducía en tiempos de incubación más cortos y una mayor acumulación de PrP^{Sc} en el cerebro (99, 100). Además, se observó que los animales que sobreexpresaban el gen *PRNP* acababan padeciendo una forma espontánea de enfermedad priónica a edades avanzadas (101). Todos estos datos establecen una relación indisoluble entre las TSE y la proteína priónica presente en el organismo del huésped, la cual aparece como esencial para el desarrollo de aquellas.

- **Evidencias basadas en modelos *in vitro***

A pesar de las numerosas evidencias ya citadas, la aceptación general de la hipótesis “solo proteína” llegaría mediante pruebas *in vitro* capaces de demostrar cómo una proteína priónica recombinante malplegada espontáneamente en un ambiente libre de cualquier mecanismo celular inducía una enfermedad priónica al ser inoculada en animales wt.

INTRODUCCIÓN

El primer sistema de propagación de priones *in vitro* vino de la mano del grupo de Byron Caughey, conocido este como ensayo de conversión libre de células (del inglés, *cell-free assay*). Este sistema permitía la conversión de PrP^C, obtenida mediante un proceso de purificación a partir de encéfalos de animales sanos, en PrP resistente a la digestión por proteasas (PrP^{res}) al añadir una pequeña cantidad de PrP^{Sc} purificada de cerebros de hámsteres sirios dorados previamente infectados con tembladera (Kocisko et al, 1994). De este modo, el grupo de Caughey demostraba que el proceso de conversión de la PrP^C en una isoforma resistente a proteasas estaba mediado por la PrP^{Sc}. Sin embargo, el bajo rendimiento de la conversión, las condiciones no fisiológicas en las que esta tenía lugar y el exceso de PrP^{Sc} necesario para el inicio de la misma dificultaban enormemente la evaluación de la infectividad de la PrP^{res} obtenida.

Esta técnica fue mejorada en el año 2001 mediante el uso de la sonicación, permitiendo la conversión de la PrP^C presente en homogeneizados de cerebros de animales sanos en PrP^{res} partiendo de una cantidad mucho menor de PrP^{Sc} y con un mayor rendimiento (102). Así nacería la amplificación cíclica de proteínas malplegadas o PMCA (PMCA (del inglés, *Protein Misfolding Cyclic Amplification*), técnica basada en la aplicación de ciclos de incubación y sonicación para la obtención de priones capaces de inducir una TSE al ser inoculado en modelos animales y que conservaban las características biológicas, bioquímicas y estructurales de la semilla iniciadora de la conversión (103). Con esta técnica volvía a remarcar la importancia de la interacción entre semilla, la PrP^{Sc}, y sustrato, la PrP^C, y se demostraba la naturaleza autocatalítica del proceso de conversión, capaz de repetirse indefinidamente siempre y cuando hubiese PrP^C disponible, apoyando de forma indiscutible la hipótesis “solo proteína”. No obstante, la presencia de factores cerebrales tanto en semilla como en sustrato que pudiesen mediar la conversión fue utilizada como argumento por parte de los detractores de la hipótesis de Prusiner.

Este escollo fue salvado en 2004, cuando Giuseppe Legname y colaboradores generaron de forma espontánea fibras amiloides *de novo* a partir de PrP recombinante producida en *Escherichia coli* (*E. coli*) en lugar de PrP^C de origen encefálico y sin necesidad de utilizar PrP^{Sc} como semilla, eliminando así cualquier componente cerebral. Tanto estas proteínas malplegadas *de novo* como otras obtenidas mediante la adición de una semilla de PrP^{Sc} demostraron ser infecciosas al ser inoculadas en animales transgénicos que sobreexpresaban la PrP^C, aunque los tiempos de incubación observados fueron significativamente más largos que al utilizar priones de origen encefálico (104). En esta ocasión, las críticas de los detractores de la hipótesis “solo proteína” se centraron en este punto, aludiendo a la capacidad de los modelos animales transgénicos que sobreexpresan PrP^C de desarrollar enfermedades priónicas de

INTRODUCCIÓN

forma espontánea y sugiriendo que las proteínas malplegadas producidas por estos métodos únicamente aceleraban la aparición de dicha enfermedad.

La primera respuesta a esta crítica llegó por parte de Iliia V. Baskakov y su grupo, quienes generaron fibras de PrP^{res} a partir del malplegamiento espontáneo de la proteína priónica recombinante de hámster sirio dorado mediante incubación y agitación. Aunque estas fibras, que mostraban un núcleo resistente de 16 kDa tras su digestión con PK, eran capaces de inducir la enfermedad en hámsteres wt, requerían de dos pases seriados de inoculación para ello, estando caracterizada esta enfermedad por signos clínicos leves y elevados tiempos de incubación (105).

Finalmente, la evidencia definitiva a favor de la hipótesis “solo proteína” fue dada por Jiyan Ma y su grupo en 2010. Utilizando un sustrato basado en PrP recombinante de ratón producida en *E. coli* a la que añadieron RNA (del inglés, *ribonucleic acid*) y lípidos como cofactores, y sometiénolo a 17 rondas seriadas de PMCA, este grupo obtuvo el primer prion recombinante obtenido en ausencia de semilla y otros componentes encefálicos capaz de causar una enfermedad priónica clásica al ser inoculado en ratones wt (106). Este logro es considerado como el punto de inflexión que puso fin a la controversia sobre la naturaleza del agente causal de las TSE, confirmando la hipótesis “solo proteína” enunciada por Prusiner 28 años antes (107).

Además, con el paso de los años la hipótesis “solo proteína” ha encontrado apoyo en otros estudios científicos no relacionados con las TSE al describirse en la naturaleza otras proteínas con comportamientos similares a los de los priones. Un ejemplo son las proteínas fúngicas Ure2 y Sup35, las cuales son capaces de adquirir una conformación diferente a la nativa e inducir ese mismo cambio conformacional en otras proteínas del mismo tipo. El grupo de proteínas a las que pertenecen Ure2 y Sup35 se conocen como priones de levadura y, a diferencia de los priones de mamífero, no se encuentran implicados en procesos patógenos, sino que forman parte del mecanismo de regulación metabólicas de las levaduras (108). Otros ejemplos de proteínas capaces de cambiar su conformación y de transmitir dicho cambio a otras proteínas del mismo tipo son el prion fúngico HET-s, descrito en hongos y también relacionado con la regulación metabólica (109), la proteína CPEB (del inglés, *Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding protein*), encontrada en la babosa marina borracha (*Aplysia californica*) e implicada en los procesos de plasticidad sináptica y formación de memoria (110) o la proteína MAVS (del inglés, *Mitochondrial AntiViral Signaling*), descrita en cultivos celulares de origen humano y que participa en la respuesta inmunológica innata (111).

INTRODUCCIÓN

A pesar de que la naturaleza proteica del agente causal de las prionopatías estaba fuera de toda duda, aún quedaba por resolver el misterio sobre cómo un agente exclusivamente proteico podía transmitir la información de cepa que se traduce en distintos fenotipos de enfermedad y diferentes propiedades biológicas y bioquímicas del agente *per se*. Esta variabilidad en las características de los priones se ha asociado a diferencias en su estado de agregación y la conformación de la propia PrP^{Sc} (112), características que se transmitirían durante el malplegamiento teoría respaldada por la capacidad de la PMCA de reproducir la características de cepa de la semilla utilizada (103), la interacción diferencial dependiente de estructura de ciertos compuestos con distintas cepas de priones (113) o la detección mediante técnicas biofísicas de diferencias estructurales entre cepas (114). Finalmente, la resolución de la estructura de la PrP^{Sc} de la cepa de hámster sirio dorado 263K por parte del grupo de Byron Caughey en 2021 permitió discernir los cambios conformacionales exactos producidos tras el malplegamiento y sentó un precedente para la resolución de la estructura de otras cepas de priones que permitan analizar las diferencias entre ellas (115).

1.2.- Historia moderna de las encefalopatías espongiformes transmisibles

1.2.1.- La encefalopatía espongiforme bovina: la primera zoonosis

Durante la década de 1980 tuvo lugar un suceso que, aunque independiente de los estudios centrados en desentrañar el agente causal de las TSE y sus propiedades, puso el foco de atención del mundo entero en las enfermedades priónicas, fomentando su estudio. Se trata de la aparición de la encefalopatía espongiforme bovina (BSE, del inglés *bovine spongiform encephalopathy*), popularizada bajo el nombre de mal de las vacas locas. Descrita por primera vez en 1985 en Inglaterra en una vaca frisona adulta y rápidamente detectada en más vacas del mismo rebaño, los análisis histopatológicos de los cerebros de los animales afectados por esta enfermedad mostraron una gran similitud a los de las ovejas enfermas con tembladera (116). Tras asociar la infección con BSE con el empleo de harinas cárnicas preparadas a partir de animales infectados para la alimentación del ganado, se prohibió en 1988 el uso de estas harinas para dicho fin. Sin embargo, desde 1985 hasta el 2006 se han contabilizado unos 180.000 casos en Reino Unido, 44.000 de ellos nacidos tras la prohibición de 1988, cuyo origen se atribuye a contaminaciones del alimento de rumiantes con el del ganado porcino o aviar, en los que no se prohibieron las harinas cárnicas hasta 1996 (117). Esto, unido a un tiempo de incubación medio de la enfermedad de cinco años, llevó a una medida preventiva en 1989 en la que se prohibía la inclusión de tejidos de vacuno con alta carga del agente causal en la cadena de alimentación humana.

INTRODUCCIÓN

Años más tarde, en 1995 se diagnosticó un caso atípico de CJD en un adolescente británico, seguido de cuatro jóvenes más durante el año posterior. La juventud de los afectados, junto con un periodo más largo de la fase clínica y diferencias histopatológicas significativas que discrepaban de la CJD clásica llevaron a esta enfermedad a ser denominada como variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vCJD) (116). La incidencia de esta nueva patología siguió creciendo en Reino Unido hasta alcanzar su máximo en el año 2000 con más de veinticinco casos diagnosticados ese año (117). El análisis bioquímico de la PrP^{Sc} presente en los individuos afectados por la vCJD realizado por el grupo de John Collinge demostró características claramente distinguibles de la CJD clásica y sorprendentemente similares a las de la PrP^{Sc} de animales afectados por BSE (116). Las evidencias histopatológicas y bioquímicas permitieron establecer una relación entre la BSE y la vCJD, siendo este el primer caso de zoonosis relacionado con una enfermedad priónica registrado, siendo la ingestión de carnes contaminadas con BSE la causa de infección más probable. Para el año 2006 ya se habían diagnosticado más de 300 casos de vCJD en Reino Unido e Irlanda del Norte, 16 en Francia, 3 en la República de Irlanda, 2 en Estados Unidos y 1 caso en Portugal, España, Italia, Países Bajos, Japón y Canadá (117).

Este acontecimiento, conocido como la crisis de las vacas locas, tenía lugar de forma paralela a los avances y descubrimientos científicos centrados en los priones descritos previamente. De este modo, las investigaciones centradas en la genética del gen *PRNP* humano tomaron una importancia capital con el fin de detener y comprender la vCJD, describiéndose la trascendencia del codón 129 de la PrP^C humana en la susceptibilidad a las TSE humanas adquiridas y espontáneas. La posición 129 de la PrP^C humana puede presentar, en todos los casos de forma natural, una metionina (129M) o una valina (129V), y, de forma muy infrecuente, una treonina (129T) (118, 119). La mayoría de los casos de CJD iatrogénica por uso de hormona del crecimiento contaminada y la totalidad de los casos de vCJD descrito hasta la fecha, salvo una excepción, son homocigotos para metionina (M129M), relacionándose este polimorfismo con una mayor susceptibilidad a las enfermedades priónicas adquiridas (120, 121). Es por ello que tradicionalmente se ha asociado la presencia de valina en la posición 129 de la PrP^C humana, ya sea en homocigosis (V129V) o heterocigosis (M129V), con una resistencia a las prionopatías de origen iatrogénico. Sin embargo, la aparición de un nuevo caso de vCJD en el Reino Unido en 2016 en un paciente heterocigoto (M129V) hizo sonar todas las alarmas al sugerir que este aminoácido podría no conferir resistencia, sino retrasar la aparición de la enfermedad, suponiendo esto un nuevo brote de vCJD en personas con valina en la posición 129 de la PrP^C que hubieran consumido carne contaminada con BSE en la década de 1980 (122). No obstante, ningún otro caso semejante ha sido detectado, señalando a lo anterior como una excepción y no como una norma.

INTRODUCCIÓN

1.2.2.- Revisitando las enfermedades priónicas humanas

Tal y como se ha ido bosquejando, aunque las TSE humanas comparten las principales características clínicas y anatomopatológicas de las prionopatías, existen formas de ellas, como la CJD clásica y la vCJD, que difieren en numerosos rasgos propios de la enfermedad, como ciertos signos y síntomas, patrones lesionales, propiedades bioquímicas del agente causal y su etiología. En lo concerniente a esto último y de acuerdo con la hipótesis “solo proteína”, hay tres posibles escenarios por los que la forma fisiológica de la proteína priónica, PrP^C, cambia su conformación transformándose en su contraparte patogénica, la PrP^{Sc}. Estos tres escenarios, con arreglo a la clasificación tradicional, dividirían las TSE humanas en tres grupos: esporádicas, siendo estas las causadas por un malplegamiento espontáneo de la PrP^C, genéticas (también conocidas como hereditarias o familiares), en las que ese malplegamiento se encuentra favorecido por ciertas mutaciones del gen *PRNP*, y adquiridas, en las que el malplegamiento se induce por la presencia de PrP^{Sc} exógena (123). No obstante, recientemente se ha propuesto una clasificación más acorde con la terminología clínica (Vidal et al, 2022 – Prion2022 - *Bona fide* spontaneous and atypical scrapie faithfully reproduced through the expression of a polymorphic variant of ovine prion protein):

- Enfermedades priónicas espontáneas: son aquellas basadas en un evento de malplegamiento espontáneo de la PrP^C, el cual tiene lugar de forma natural sin estímulo de tipo alguno. Todas las TSE aquí recogidas pueden considerarse como esporádicas en tanto que se dan de forma ocasional, sin precedentes ni consiguientes. Dentro de este tipo de prionopatías se recogen dos subgrupos:
 - Enfermedades priónicas genéticas: son aquellas asociadas a una mutación o variación del gen *PRNP*, aproximadamente el 15% de las TSE humanas. Aunque se trata de un gen muy conservado a nivel evolutivo, son numerosos los polimorfismos descritos en las distintas especies. En el caso de la humana, diferentes variantes en este gen se relacionan con las formas genéticas de CJD (gCJD), el FFI y el GSS, siendo las más comunes las mutaciones E200K, V210I y V180I en el caso de las gCJD, la mutación D178N, responsable de la forma genética de FFI cuando coexiste con los polimorfismos M129M o M129V, y la mutación P102L para el GSS (124, 125).
 - Enfermedades priónicas idiopáticas: son aquellas que tienen lugar sin causa conocida, las más frecuentes al corresponderse con el 85% de las TSE humanas totales, con una incidencia de entre 1 y 2 casos por millón de habitantes al año (126). Sin causa aparente

INTRODUCCIÓN

que desencadene el malplegamiento de la PrP^C, el origen de estas enfermedades se asocia a un evento puramente espontáneo. Engloba a las denominadas formas esporádicas de CJD (sCJD), el insomnio esporádico letal (sFI, del inglés, *spontaneous fatal insomnia*) y la VPSPr. La sCJD, a pesar de ser la TSE idiopática más común entre los humanos, presenta una gran variabilidad tanto a nivel clínico como en la bioquímica del agente causal, lo cual podría asociarse a la existencia de diferentes cepas (127). Estas diferencias bioquímicas, junto con las posibles opciones que ofrece la posición 129 de la PrP^C del paciente, han sido relacionadas de forma sistemática con el fenotipo manifiesto de la enfermedad, destacando de nuevo la importancia que ese codón tiene en los distintos tipos de TSE humanas y permitiendo la clasificación de las diferentes formas de sCJD (128).

- Enfermedades priónicas adquiridas: son aquellas basadas en un malplegamiento de la PrP^C del paciente mediado por un agente exógeno, la PrP^{Sc}, el cual puede entrar en el organismo por vías tales como la oral, en el caso de los ya descritos kuru o vCJD, o mediante prácticas médicas que impliquen elementos contaminados, dando lugar a la CJD iatrogénica (iCJD)(2).

Aunque diferentes en numerosos aspectos, todas las TSE tienen un desenlace fatal para el paciente. Es por ello que la búsqueda de una terapia eficaz contra ellas ha sido uno de las principales metas de la comunidad médica y científica desde la descripción de los primeros casos, antes incluso de conocerse la naturaleza de su agente causal. De esta manera, cuando la teoría del virus lento era la más aceptada, tratamientos antivirales como el aciclovir, la amantadina o el interferón fueron testados sin éxito. Tras descartar el posible origen vírico de las TSE, el tratamiento se centró en las manifestaciones neurológicas observadas, destacando los antidepresivos, anticonvulsionantes y analgésicos, muchos de los cuales se siguen utilizando hoy en día como tratamientos paliativos de los síntomas (129). Actualmente, las estrategias terapéuticas se basan en evitar la propagación priónica y sus efectos neurotóxicos, para lo cual se están abordando diferentes enfoques, como reducción de la cantidad de PrP^C mediante inhibición de su expresión o mediante el aumento de su degradación, la estabilización de la PrP^C para evitar su malplegamiento, el bloqueo de la interacción PrP^C-PrP^{Sc} o la inhibición de la formación de agregados de PrP^{Sc} y/o su degradación mediante la acción de compuestos antipriónicos o la estimulación del sistema inmunitario (130). Entre estos enfoques, hay planteamientos experimentales que podrían traducirse en prometedoras terapias, como el uso de chaperonas moleculares como estabilizadoras de la PrP^C del paciente impidiendo su conversión a PrP^{Sc}, entre las que destaca la porfirina TMPyP-FeIII (del inglés, *Iron (III) meso-Tetra(N-methyl-4-pyridyl)porphine*) (131), el diseño de oligonucleótidos antisentido (ASO, del inglés, *AntiSense Oligonucleotides*) con la capacidad de unirse de

INTRODUCCIÓN

forma complementaria y específica al mRNA del gen *PRNP*, disminuyendo la expresión de PrP^C en el paciente (132), y la tecnología de las proteínas dedos de cinc asociadas a factores de transcripción (ZF-TFs, del inglés, *zinc finger protein transcription factors*) cuyo mecanismo de acción es semejante al de los ASO, interfiriendo con el mRNA del gen *PRNP* y reduciendo la expresión de PrP^C (Zeitler et al, 2022 – Prion2022 - Engineered zinc finger protein transcription factors potently reduce brain PrP expression and extend survival in prion-infected mice). Mientras que las estrategias terapéuticas descritas aún se encuentran en fase experimental, hay que destacar dos potenciales tratamientos cuya eficacia en humanos está siendo analizada: el ensayo clínico de uso compasivo liderado por John Collinge en Reino Unido, basado en el uso del anticuerpo monoclonal PRN100, capaz de unirse a la PrP^C de los pacientes impidiendo su unión con la PrP^{Sc} y posterior malplegamiento (133, 134), y el ensayo clínico de carácter preventivo liderado por Fabrizio Tagliavini en Italia, en el que personas presintomáticas portadoras de la mutación que predispone al desarrollo de FFI están siendo tratadas con doxiciclina (135). La doxiciclina es un compuesto antibiótico cuya capacidad antiprionica ha sido probada previamente, llegando a haberse utilizado incluso en un ensayo clínico de uso compasivo con pacientes con CJD (136).

Sin embargo, para que cualquiera de estas posibles estrategias terapéuticas pueda aplicarse al paciente de forma eficaz es necesario un diagnóstico rápido y con alta sensibilidad y especificidad. Entre los métodos diagnósticos más habitualmente utilizados en hospitales que permiten la detección de una enfermedad priónica destacan el electroencefalograma, la resonancia magnética y el análisis de sangre y líquido cefalorraquídeo (CSF, del inglés, *cerebrospinal fluid*) (137). Aunque el electroencefalograma puede aportar información importante para el diagnóstico, esta técnica solo permite detectar la enfermedad priónica en un estadio tardío, mientras que, por el contrario, la resonancia magnética sí permite una detección temprana de la enfermedad, convirtiéndose en una parte valiosa de los criterios diagnósticos utilizados comúnmente (138, 139). Finalmente, el análisis de sangre y CSF permite la detección de biomarcadores de las TSE, como la proteína 14-3-3, la proteína tau total o la ratio de proteína tau fosforilada frente a la proteína tau total, el neurofilamento de cadena ligera (NFL, del inglés, *neurofilament light chain*) o, como no podía ser de otra manera, los niveles totales de PrP (140). Existen también otros tipos de técnicas más novedosas y, aunque poco extendidas en el ámbito clínico, cada vez más aceptadas y utilizadas en los hospitales. Estas técnicas se basan en la amplificación de la PrP^{Sc} presente en el CSF del paciente hasta alcanzar cantidades detectables, lo que las convierte en pruebas *pre mortem* de alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de TSE, siendo la más prometedora la conversión inducida por agitación en tiempo real (RT-QuIC, del inglés, *Real Time – Quaking Induced Conversion*) (141, 142). Por

INTRODUCCIÓN

último, es importante considerar el historial familiar del paciente para el correcto diagnóstico, contemplando la posibilidad de formas genéticas de TSE como la gCJD, el FFI y el GSS (137).

1.2.3- Las encefalopatías espongiformes transmisibles en la actualidad

Tal y como se ha visto, las enfermedades priónicas, aunque enfermedades raras y, por ende, poco conocidas, han dejado su impronta de una forma u otra, tanto en el mundo científico debido a lo “herético” de su agente causal, el prion, que desafiaba todo lo establecido por la biología molecular, como en el imaginario popular tras la terrible crisis de las vacas locas. Esto se ha traducido en la aparición de las prionopatías en diferentes medios, como en el escrito, donde encontramos recopilaciones de estilo académico, como el libro *The collector of lost souls*, en el que su autor, Warwick Anderson, relata el hallazgo y caracterización del kuru desde un punto de vista antropológico y con un estilo biográfico centrado en los protagonistas de este descubrimiento, o *La familia que no podía dormir*, de D. T. Max, un ensayo con estilo de novela que parte del caso real de una familia afectada por FFI para reconstruir el descubrimiento de las enfermedades priónicas en general, desde el kuru hasta la epidemia causada a raíz de la BSE. Por otra parte, en el ámbito de los medios de comunicación, ya fuese por escrito, por radio o televisión, fueron numerosos los artículos, noticiarios y programas centrados en las BSE y su relación con la vCJD durante la década de 1990 y de 2000, siendo más que probable que el nombre con el que se conoce popularmente, el mal o enfermedad de las vacas locas, se deba a su gancho mediático. Aunque la presencia en los medios sea menos, la caquexia crónica de cérvidos también ha aparecido más de una vez, recibiendo su propio apodo mediático en la forma de “la enfermedad de los ciervos zombis”. Con respecto a este alias, cabe destacar la portada que se le dedicó a la CWD en el semanario de humor satírico, El Jueves, si bien en ella se referían a su agente causal como virus, obviando los últimos cuarenta años de investigación en el campo de los priones. En el ámbito de la ficción audiovisual, las enfermedades priónicas han aparecido de forma realista en el capítulo *Guardian Angels* de la exitosa serie *House*, aunque fuese solamente como un posible diagnóstico para un paciente, de una forma más imaginativa, como en el aclamado videojuego *Batman: Arkham Knight*, en el que uno de los antagonistas principales infecta a una serie de personas con priones mediante transfusiones de sangre, causando la prionopatía ficticia llamada *mad clown disease*, o de forma mucho más fantasiosa, como en la serie *V-Wars*, en la que un prion congelado en un glaciar es capaz de activar un gen presente en algunas personas, convirtiéndolas en vampiros.

Si bien se puede desestimar sin riesgo a equivocarse cualquier vínculo posible entre priones y vampiros, las características generales de las enfermedades priónicas establecen una clara relación con

INTRODUCCIÓN

otras enfermedades neurodegenerativas. Entre ellas se cuentan la enfermedad de Alzheimer (AD, del inglés, *Alzheimer disease*), la enfermedad de Parkinson (PD, del inglés, *Parkinson disease*), la demencia de los cuerpos de Lewy (LBD, del inglés, *Lewy body dementia*), la esclerosis lateral amiotrófica (ALS, del inglés, *amyotrophic lateral sclerosis*) y la demencia frontotemporal (FTD, del inglés, *frontotemporal dementia*), entre otras. Estas enfermedades se encuentran agrupadas bajo el término amiloidosis, denominación en la que se podrían incluir las enfermedades priónicas, en tanto que todas ellas están causadas por amiloides, depósitos de proteínas malplegadas que presentan una estructura secundaria rica en láminas- β y que han sido formados por la acción de una proteína con conformación aberrante que actúa como semilla, siendo capaz de transmitir dicha conformación a otras proteínas del mismo tipo. De esta manera, el rasgo principal que diferenciaría a las enfermedades priónicas del resto de amiloidosis neurodegenerativas sería la naturaleza transmisible de las primeras, habiéndose probado una infectividad muy baja o nula de los amiloides característicos del resto de enfermedades indicadas (143). Este hecho ha desencadenado un nuevo debate en el ámbito científico sobre la terminología adecuada para referirse a ellas. Por una parte, destaca la postura del propio Prusiner, quien actualizaría el término prion a “proteína capaz de adquirir una conformación alternativa y tornarse auto-propagativa”, englobando al agente causal de todas las enfermedades aludidas y agrupando a estas en la misma categoría (144). Por el contrario, el término tipo-prion (en inglés, *prion-like*) hace referencia a aquellos agente o enfermedades que presentan propiedades o mecanismos semejante a los priones, sin ser tales, de manera que se mantiene una diferenciación entre las TSE y el resto de enfermedades neurodegenerativas causadas por amiloides (145). El adjetivo tipo-prion engloba otros términos propuestos, como cuasi-prion (agregados proteicos capaces de transmitirse a la progenie, pero cuya transmisión horizontal no ha sido probada) o prionoide (agregados proteicos que pueden propagarse y transmitirse entre células, pero de infectividad no demostrada) (146, 147). A día de hoy, son numerosos los seguidores y detractores de una terminología u otra, siendo lo más común la diferenciación entre las enfermedades priónicas, causadas por priones, y las enfermedades tipo-prion, causadas por el amiloide característico de cada caso (143).

2.- Biología de los priones

Los avances realizados en el conocimiento de las EET o prionopatías desde su descripción inicial hasta la formulación de la hipótesis “solo proteína”, establecieron el indiscutible protagonismo de la

INTRODUCCIÓN

proteína del prion o PrP y la conversión que sufre a su forma neurotóxica, como evento central de estas patologías, siendo por tanto la PrP^C y la PrP^{Sc}, dos caras de una misma moneda.

2.1.- PrP^C

2.1.1.- Genética de la PrP^C

El gen que codifica la proteína del prion o PrP fue clonado en 1986, demostrando que tanto la isoforma celular no patogénica o PrP^C como la isoforma neurotóxica o PrP^{Sc}, estaban codificadas en el mismo gen (68). En el caso de los humanos, el gen *PRNP* se localiza en el brazo corto del cromosoma 20 o en la región homóloga del cromosoma 2 en ratones. Este gen se encuentra altamente conservado dentro de los mamíferos, siendo la similitud menor entre estos y las aves, pero existiendo también patrones similares pese a que les separan más de 130 millones de años de evolución (148). Así, se han descrito genes homólogos en otros vertebrados que presentan considerables variaciones en la secuencia aminoacídica pero que presentan motivos estructurales semejantes, como es el caso de la tortuga (*Trachemys scripta*) o la rana (*Xenopus laevis*), cuya similitud de secuencia con la PrP de mamíferos es aproximadamente del 30%. La alta conservación de este gen sugiere que algunas de las funciones que desempeña la PrP^C podrían ser cruciales para la vida (149).

Este gen de copia única que se denomina *PRNP* contiene su marco de lectura abierto (ORF, del inglés *Open Reading Frame*) en un único exón en todas las especies de mamíferos y aves en las que se ha estudiado. Sin embargo, el gen *PRNP* contiene uno o dos exones más que contienen regiones no codificantes, incluyendo un promotor y los sitios de terminación. En algunas especies como el hámster, es el exón 2 el que contiene el ORF, mientras que en otras especies como la oveja, el ratón o el humano, esta función la cumple el exón 3 (150). La ORF del gen *PRNP* presenta un tamaño similar en todas las especies de mamífero de aproximadamente 760 pares de bases (pb), encontrándose su codón de inicio diez pares de bases después del comienzo del exón. Dicho codón está seguido de una región que codifica un péptido señalizador responsable del transporte de la proteína a la membrana celular. La ORF de 255 codones aproximadamente, es mayor que la media para los genes eucariotas, lo que sugiere su evolución como unidad completa, explicando así la gran similitud entre las PrP de distintas especies de mamífero. La primera parte de la región codificante presenta un alto contenido en nucleótidos de guanina (G) y citosina (C), traducándose posteriormente en una zona de aminoácidos repetidos rica en glicina y que

INTRODUCCIÓN

resulta prácticamente idéntica en todas las especies, variando únicamente en el número de repeticiones y estando asociada a variantes genéticas de la enfermedad (151).

El gen *PRNP* se expresa de forma constitutiva y ubicua en todo el organismo y presenta una serie de características comunes a los genes constitutivos o *housekeeping*. Una de ellas es precisamente la presencia de la región de repeticiones de guanina y citosina, que constituye un motivo conocido como caja GC y que es considerado como sitio de unión canónico para los factores de transcripción humanos Sp1, AP-1 y AP-2 que, entre otros muchos, controlan la expresión génica en diversos tejidos (152). Los factores de transcripción relacionados con el gen *PRNP* permiten modular además la expresión de la PrP^C ante situaciones determinadas, como, por ejemplo, la señalización por factores de crecimiento o por elementos de estrés, como el estrés oxidativo o el estrés genotóxico (153). Aunque la expresión de la PrP^C tiene lugar de forma constitutiva en el cerebro de animales adultos, se encuentra altamente regulada durante el desarrollo, aumentando en algunas regiones de forma proporcional a enzimas como la acetiltransferasa (154) o en función de la edad, ya que la expresión de PrP^C se ve incrementada a lo largo del desarrollo embrionario, siendo apenas detectable al inicio de este e incrementando de forma destacada justo después del nacimiento (155). Aunque la PrP^C se expresa mayormente en el sistema nervioso central, también se encuentra en el sistema nervioso periférico, donde se puede detectar a niveles más bajos a lo largo de nervios periféricos, ganglios, membrana olfativa y retina. Además del sistema nervioso, hay otros tejidos en los que destaca la expresión de PrP^C, como la médula ósea, los órganos linfoides, el corazón, el músculo esquelético y el pulmón (156).

A pesar de ser un gen muy conservado evolutivamente, hay regiones variables en la *secuencia primaria de la PrP* que resultan en una enorme diversidad de polimorfismos observables en la naturaleza. A algunos de estos polimorfismos se les responsabiliza de determinadas diferencias en la susceptibilidad frente a las enfermedades priónicas, como es el caso del scrapie y algunas de las variantes polimórficas de la PrP de oveja (157), o el polimorfismo del residuo 129 en humanos, que parece tener un papel fundamental en la incidencia de CJD, tanto en su forma esporádica como en su variante adquirida (118). Existen también mutaciones autosómicas dominantes en el gen *PRNP* que se relacionan de forma directa con la aparición de enfermedades priónicas. Aunque profundizaremos más adelante en las variantes genéticas de la enfermedad, hay que destacar que se han descrito más de 40 mutaciones patológicas diferentes en este gen, entre las que encontramos mutaciones puntuales, codones de terminación prematuros o inserciones y deleciones en la zona de octa-repeticiones (158).

INTRODUCCIÓN

2.1.2.- Biosíntesis y componentes de la PrP^C

La proteína del prion es una glicoproteína sintetizada inicialmente como un polipéptido precursor de aproximadamente 250 aminoácidos según la especie que se considere. Esta proteína, presenta un péptido señal en la zona amino-terminal (N-terminal), una región de octa-repeticiones, un dominio globular que presenta dos sitios de glicosilación y un puente disulfuro y, por último, una señal de anclaje a la membrana situada en la región hidrofóbica carboxi-terminal (C-terminal) (Figura 3). La biosíntesis comienza con la generación del péptido señal de la proteína precursora, compuesto de 22 aminoácidos, y que es reconocido por partículas de reconocimiento de señal (SRP, del inglés, *Signal Recognition Particle*), que lo transportan al retículo endoplásmico rugoso (RER), donde gracias a la acción de una enzima translocasa, tiene lugar la translocación al lumen del polipéptido de manera cotranslacional. La integridad de este péptido señal es fundamental para la importación correcta del polipéptido, ya que un transporte ineficaz causaría la acumulación anormal de PrP^C en el citosol, interfiriendo con la viabilidad celular (159). El procesamiento continúa en el retículo, donde dos residuos de cisteína situados en las posiciones 179 y 214, quedan unidos por la formación de un puente disulfuro que aporta estabilidad a la proteína. En este punto también tiene lugar la glicosilación de hasta dos asparaginas, situadas en las posiciones 181 y 197 para el caso de la PrP humana y que se pierden cuando se añaden tratamientos inhibidores de la glicosilación en el retículo, como es el caso de la tunicamicina (160). Las dos cadenas de oligosacáridos añadidas en este punto presentan un alto contenido en manosa y no son resistentes a la digestión con endoglicosidasa H, propiedad que adquirirán más adelante con la adición de cadenas más complejas de hidratos de carbono (160). La PrP^C presenta en su extremo C-terminal un péptido señal para glicosilfosfatidilinositol (GPI), que media el anclaje de la PrP^C a membrana celular, y se agrega al polipéptido en el lumen del RER gracias a la acción de una transamidasa multimérica (78). Durante el proceso, se elimina el péptido señal de 22 aminoácidos del extremo C-terminal, que se sustituye por un GPI preformado, mediante un proceso complejo en el que intervienen varias enzimas. La transamidasa multimérica únicamente cataliza la reacción final de unión del GPI a la proteína. Este GPI está formado por una etanolamina fosfato unida al carboxilo terminal de la proteína mediante un enlace amida, un núcleo glicano altamente conservado de tres residuos de manosa, glucosamina, un grupo fosfatidilinositol y colas fosfolipídicas que anclan el GPI a la membrana (161). Con su posterior llegada al aparato de Golgi, se añaden a la cadena polipeptídica oligosacáridos más complejos que contienen ácido siálico, siendo la PrP^C una de las tres únicas proteínas de membrana plasmática que presentan ácido siálico a nivel estructural (162). Además de ácido siálico, se han descrito una gran variedad de glicanos que pueden

INTRODUCCIÓN

unirse a la PrP^C o a su forma truncada, lo que produce distintos patrones de distribución en el cerebro. Sin embargo, el significado biológico de las glicosilaciones de la PrP^C sigue siendo desconocido (163). A continuación, la PrP^C madura es transportada a la membrana plasmática a través del aparato de Golgi, donde se orienta hacia el compartimento extracelular y aparece localizada en balsas lipídicas, conjuntos dinámicos ricos en colesterol y esfingolípidos (164).

La ruta y los mecanismos de internalización y endocitosis de la PrP^C son controvertidos ya que podrían involucrar vías tanto dependientes como independientes de clatrina. La PrP^C ha sido localizada en vesículas recubiertas de clatrina por microscopía electrónica (165), pero también asociada a unas estructuras membranosas denominadas caveolas o a dominios morfológicamente similares las mismas. Estas dos vías, aparentemente contradictorias, quedan reconciliadas por el papel que algunas regiones de la PrP^C parecen desempeñar uniendo cationes, como la endocitosis mediada por clatrina inducida por cobre, señalando que la PrP^C se encuentra sometida a procesos de reciclado y degradación constitutivos (164).

La traducción y el posterior procesamiento, en el que se eliminan ambos péptidos señal, dan como resultado una PrP^C madura, de aproximadamente 210 aminoácidos y un peso molecular de 26-37 kDa según su estado de glicosilación (Figura 3 a). En esta PrP^C se distinguen claramente dos dominios de similar tamaño estructuralmente diferenciados entre sí; el dominio flexible N-terminal y el dominio globular C-terminal (123). El dominio N-terminal de la PrP^C comprende desde el aminoácido 23 al 124 en el caso de la PrP humana, siendo una región desestructurada y flexible según los datos que hasta la fecha se han recopilado con la técnica de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) e incluyendo varias regiones características (166). En primer lugar, se encuentran dos pequeñas regiones polibásicas (de aminoácidos cargados positivamente) que se denominan CC1 y CC2 (CC, del inglés, *Charged Cluster*) y que se encuentran en los aminoácidos 23-27 y 95-110 respectivamente. Estas zonas parecen estar involucradas en la actividad antioxidante de la PrP^C y en la interacción de esta con tubulina o glicosaminoglicanos (167, 168). Justo en mitad de estas dos regiones polibásicas encontramos la zona de octa-repeticiones (OR), fruto de la traducción de la zona rica en C/G del gen *PRNP* mencionada en un punto anterior. Esta región se sitúa aproximadamente entre los aminoácidos 54 y 94, según la especie, y está compuesta por varias repeticiones de una secuencia variable de ocho aminoácidos, siendo la más común la secuencia PHGGGWGQ, que está altamente conservada en todos los mamíferos (169). El número de repeticiones de esta secuencia varía según la especie, aunque mayoritariamente suele ser de cinco. La presencia de

INTRODUCCIÓN

inserciones o deleciones en la región de las octa-repeticiones (OPRI o OPRD, del inglés, *Octapeptide Repeat Insertions* y *Octapeptide Repeat Deletions*) está asociada a enfermedades genéticas (151). Aparte de por su relación con variantes genéticas de la enfermedad, muchas investigaciones de las últimas décadas se han centrado en la zona de OR intentando encontrar una función biológica a este peculiar motivo aminoacídico, al que se le suele asignar un papel en la neuroprotección. Ratones transgénicos que expresaban el gen de la PrP murina con una deleción de las cinco octa-repeticiones, mostraron una menor activación de la 3-fosfatidilinositol quinasa, una enzima reguladora de la supervivencia celular, lo que se traducía en una actividad neuroprotectora disminuida (170). Una de las funciones más ampliamente estudiadas de la región de OR es su capacidad para unir cationes bivalentes, concretamente el Cu^{2+} y el Zn^{2+} (171, 172). Además, también se ha demostrado que esta zona de OR tiene tendencia a la agregación y, por tanto, podría jugar un papel importante en la patología (173).

La siguiente región de la PrP^C es el dominio globular C-terminal, que se encuentra conectado al dominio flexible N-terminal mediante una región hidrofóbica que comprende los aminoácidos que van del 111 al 134 y que se conoce como HC (del inglés, *Hydrofobic Core*). Gracias a los datos de RMN y tomando como referencia la PrP murina, se pueden identificar distintos motivos estructurales; dos pequeñas regiones de lámina- β antiparalelas ($\beta 1$ y $\beta 2$) flanqueando una primera hélice- α ($\alpha 1$) y otras dos hélices- α ($\alpha 2$ y $\alpha 3$) tras la segunda lámina- β (166). Estos motivos estructurales están conectados por giros, entre los que destaca la región $\beta 2$ - $\alpha 2$, una zona de alta diversidad estructural y polimórfica que puede formar un giro rígido (RL, del inglés *Rigid Loop*) bien definido o puede ser estructuralmente flexible. Esta característica explica el hecho de que a varias posiciones de esta región se les haya asociado con distintas susceptibilidades frente a EET y del fenómeno de barrera de transmisión entre especies (Figura 3 b) (174, 175). En el dominio globular se localizan algunos de los aminoácidos clave en el procesamiento de la PrP^C; dos residuos de cisteína (posiciones 179 y 214 en la PrP humana), responsables del puente disulfuro que se forma en el RER y que aporta estabilidad a la proteína y dos residuos de asparagina (posiciones 181 y 197 en la PrP humana), susceptibles de ser N-glicosilados. En función del número de N-glicanos que se unan a la PrP^C, esta puede encontrarse en su forma di-glicosilada, mono-glicosilada o no glicosilada. El estado de glicosilación de la PrP^C y la proporción de las tres formas varía entre las diferentes especies y se ha utilizado para la caracterización de esta. Sin embargo, hoy en día no se conoce la implicación de los N-glicanos en la función biológica de la proteína ni el mecanismo que pueden desempeñar en el malplegamiento de la misma (123, 163). Aunque existen mutaciones puntuales asociadas a enfermedades priónicas de origen genético en la región N-terminal y en la zona del GPI, es en el dominio globular donde

INTRODUCCIÓN

se localizan la mayoría de las mutaciones puntuales asociadas a las EET genéticas, entre las que destacan la sustitución D178N, asociada a FFI junto al polimorfismo del codón 129 y la E200K, la mutación más común a nivel mundial causante de la variante genética del CJD (176).

En la última parte del dominio globular de la PrP^C, encontramos la región de anclaje a través de GPI, unido a un residuo de serina situado en la posición 230 para el caso de la PrP murina. El anclaje de un grupo GPI a una proteína es una modificación post-traducciona muy común en eucariotas, estando presente en más de 150 proteínas de mamíferos. Está formado por un grupo de fosfoetanolamina que sirve de unión con la proteína mediante un enlace covalente y un glicano compuesto por tres moléculas de manosa y una cola de inositol-fosfolípido, aunque los tres núcleos de manosa pueden variar sus cadenas laterales según la proteína a la que se encuentren unidas (177). Estas proteínas que presentan unión a GPI son funcionalmente diversas y están involucradas en diferentes rutas biológicas, entre las que se encuentran la respuesta inmunológica, la traducción de señales, el mantenimiento de la morfología celular y, en el caso de la PrP, un posible papel en la aparición de enfermedades priónicas (161). Una de las capacidades más desconcertantes de este grupo de proteínas con GPI es su habilidad para insertarse en las membranas, tanto *in vitro* como *in vivo*, de forma aparentemente espontánea en un proceso que también ha sido observado en la PrP^C (178). Centrándonos en su implicación en el desarrollo de la enfermedad, en primer lugar, se ha observado que la localización de la PrP^C en balsas lipídicas gracias al GPI es importante para la conversión, hecho respaldado por la proteína Sup35, un prion de levaduras, que puede ser propagado a células vecinas únicamente cuando está unido a un GPI (179). Sin embargo, existen modelos transgénicos de ratón que, expresando PrP^C sin GPI, sufren la enfermedad tras ser inoculados con priones. Estos ratones, debido a la ausencia de GPI, presentan una PrP^C que no se localiza en la membrana plasmática, sugiriendo que esta localización podría no ser necesaria para el malplegamiento de la PrP^C. Sin embargo, estos ratones infectados con priones murinos mostraron un retraso en la aparición de los signos de enfermedad, presentando además alteraciones neuropatológicas, como la distribución atípica de las placas de PrP^{Sc} y la ausencia de lesiones espongióticas (180).

INTRODUCCIÓN

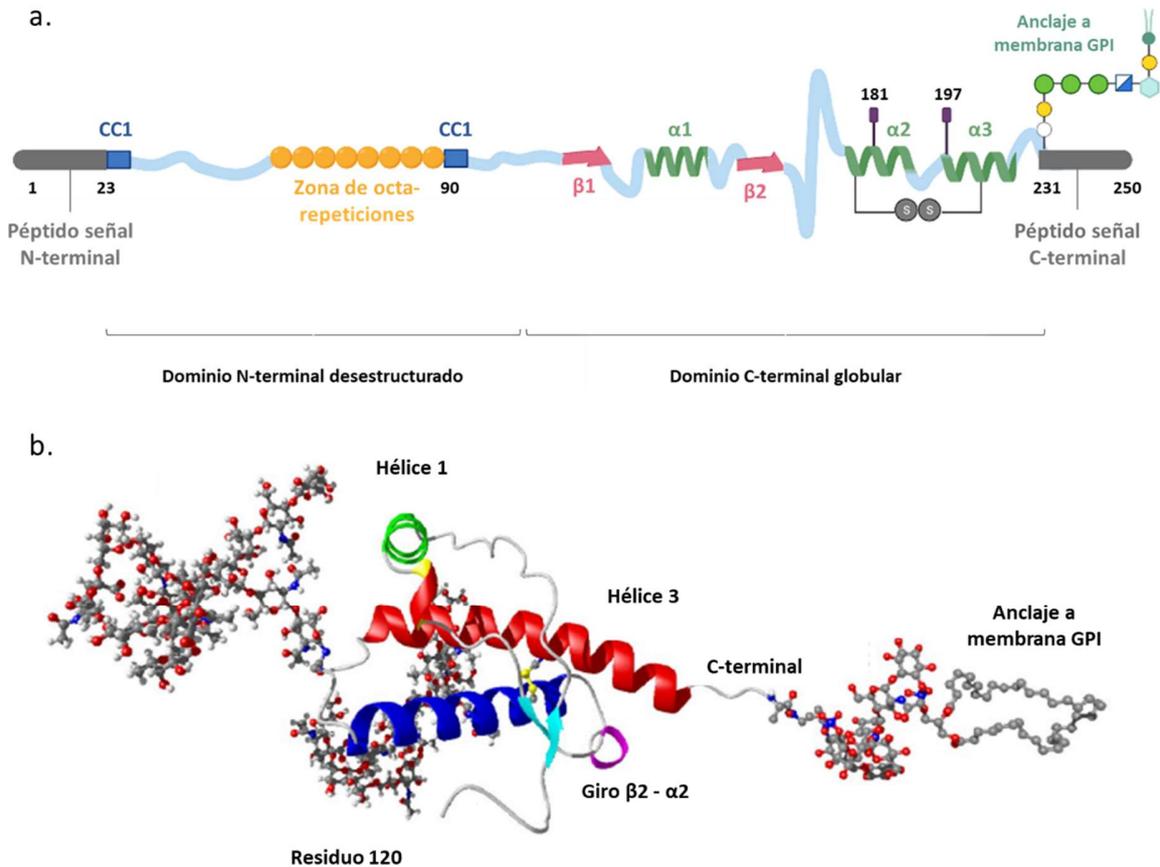


Figura 3. Representación esquemática de la PrP^C y estructura tridimensional de la PrP^C resuelta mediante difracción de rayos X. a) Representación esquemática de los diferentes motivos y dominios de interés de la PrP^C. La numeración hace referencia a la posición de los aminoácidos en la PrP^C humana. Péptido señal de 23 aminoácidos del dominio N-terminal que dirige la PrP^C hacia la membrana plasmática y es eliminado durante el procesamiento. Flanqueando a la zona de octa-repeticiones (OR, del inglés, *octapeptide repeats*), constituida por una secuencia de 8 aminoácidos repetida 5 veces en humanos, se localizan las regiones cargadas positivamente CC1 y CC2 (del inglés, *Charged Cluster*), tras las que existe una zona rica en aminoácidos con carácter hidrofóbico. En el dominio globular aparecen las dos regiones estructuradas en forma de láminas- β antiparalelas ($\beta 1$ y $\beta 2$) y las tres regiones estructuradas en forma de hélices- α ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y 3). Dentro de la zona globular también aparecen esquematizados el puente disulfuro entre las posiciones 179 y 214, las asparaginas que pueden ser modificadas por la adición de glicanos y el glicosofatidilinositol (GPI) para su anclaje a membrana, determinado por el péptido señal C-terminal que se elimina tras su adición en el aminoácido 231. b) Estructura tridimensional de la PrP^C ovina determinada mediante difracción de rayos X (*Protein Data Bank code 1UW3*) y en la que se ha omitido la región N terminal no estructurada formada por los aminoácidos comprendidos entre las posiciones 23 y 120 y se incluyen los dos glicanos, el GPI y se señalan algunos de los principales motivos estructurales (hélices- α 1 y 3 y giro $\beta 2$ - $\alpha 2$ situado entre la lámina- β 2 y la hélice- α 2). Modificada de Aguzzi 2009.

Cabe destacar también, que se han descrito tres mutaciones puntuales (M232R, M232T y P238S) localizadas en la zona de unión al GPI de la PrP^C y que desencadenan variantes genéticas de la enfermedad priónica (181). Estos datos parecen indicar que el GPI juega un papel fundamental en la neurotoxicidad, pero no en el malplegamiento y la propagación de priones, tal y como apoyan los experimentos llevados a cabo por Lewis y colaboradores, que eliminaron químicamente el GPI de priones preformados y

INTRODUCCIÓN

demonstraron que su ausencia no disminuía su capacidad de infectar a otros modelos que sí expresan la PrP^C anclada a membrana por GPI (182). Por tanto, en conjunto, todos estos hallazgos sugieren que el GPI no tiene un papel clave en la capacidad de inducir el malplegamiento de la PrP^C, pero sí en los efectos neurotóxicos derivados de dicho malplegamiento.

2.1.3.- Posibles funciones de la PrP^C

Pese a la gran cantidad de información recopilada en las últimas décadas acerca de la genética, biosíntesis y estructura de la PrP^C, la función biológica que desempeña esta proteína no ha sido dilucidada aún. Su amplia distribución en prácticamente todos los tejidos del organismo y su alto grado de conservación entre mamíferos y gran parte de vertebrados sugieren que esta proteína desempeña una función esencial. Concretamente, su localización en la superficie de la membrana celular indica que podría desempeñar algún rol en procesos ligados al reconocimiento y adhesión celular, a la absorción de ligandos externos o como mediador de señalización transmembrana, aunque ninguna de estas funciones ha sido inequívocamente demostrada como cometido fisiológico de la PrP^C. Una de las primeras aproximaciones para estudiar las posibles funciones de la PrP^C, fue la generación de modelos animales que no expresaban PrP^C (*PRNP*^{-/-} o KO, del inglés, *knockout*) (183) en ratones e incluso terneros (184) y cabras, estas últimas encontradas sin manipulación alguna en la Naturaleza (185). Estos modelos transgénicos mostraron resistencia a la infección por priones, pero no exhibieron alteraciones fenotípicas obvias, lo que indica que la función de la PrP^C no resulta esencial para la supervivencia del organismo a pesar de la ubicuidad de su expresión, o bien puede compensarse por la acción de otras proteínas o es redundante (186). Sin embargo, hay que tener en cuenta que desde la aparición del primer modelo KO para la PrP^C (*PNRP*^{-/-}), se ha generado una miríada de modelos murinos transgénicos deficientes en PrP siguiendo diversas estrategias (187). Esto ha llevado a que, en algunos casos, se hayan observado ligeras alteraciones fenotípicas que difieren entre los distintos modelos transgénicos deficientes de PrP^C. Algunos ejemplos son las alteraciones en el sueño y los ritmos circadianos observados en ratones KO para la PrP^C y la relación sugerida entre este hecho y las mutaciones en el gen *PRNP* causantes del FFI (188, 189), un posible papel en la excitabilidad neuronal y el aprendizaje (190) y la actividad antioxidante de la PrP^C, consecuencia de su capacidad para unir cationes de Cu⁺² por la región de OR (171, 191). Sin embargo, estos fenotipos no fueron encontrados en todos los modelos de ratones KO para la PrP^C diseñados con distintas estrategias, llegando a variar los resultados incluso en modelos similares, siendo el único fenotipo claro para todos ellos la resistencia de los ratones KO a la infección por priones (192). Esta afirmación quedó respaldada

INTRODUCCIÓN

por los estudios de Chesebro y colaboradores mencionados anteriormente, en los que demostraron la necesidad de una PrP^C funcional para el desarrollo de la enfermedad (180), y los experimentos de implantación de tejido con PrP^C en ratones KO-PrP que posteriormente mostraron niveles de PrP^{Sc} homogéneos en todo el SNC pero neurotoxicidad únicamente en el tejido injertado (193). Por lo tanto, una de las pocas funciones demostradas de la PrP^C sería como mediadora de la neurotoxicidad en las enfermedades priónicas, pudiendo incluso interactuar con proteínas responsables de otras enfermedades neurodegenerativas, como el péptido A β de la enfermedad de Alzheimer (194).

Estos hechos respaldan un posible papel de la PrP^C en la neurotoxicidad de ciertas patologías, pero no es posible concluir que esa sea su única función, ya que parece poco probable que una proteína tan conservada a lo largo de la evolución en diferentes especies presente únicamente una función patológica. Con el objetivo de dilucidar nuevas funciones fisiológicas de la PrP^C no relacionadas con las EET pero que nos ayuden a comprender mejor el origen de estas y los mecanismos de toxicidad, en las últimas décadas se han desarrollado nuevos modelos de estudio y técnicas *in vitro*. Algunos ejemplos son las investigaciones en pez cebra (*Danio rerio*) relacionadas con la adhesión celular mediada por PrP^C (195) o los estudios sobre su posible función en la conservación de la integridad de la mielina periférica (196). Estos y otros nuevos enfoques han dado lugar a la atribución de posibles y diversas funciones a la PrP^C, pudiendo estar implicada en procesos que van desde el desarrollo de neuritas hasta la adhesión celular, pasando por excitabilidad neuronal, citoprotección y actividad de canal iónico (197). Sin embargo, tal y como ocurría en las funciones observadas en modelos transgénicos KO-PrP (192), muchas de ellas necesitan ser validadas.

2.2.- PrP^{Sc}

A diferencia de lo que ocurre con la PrP^C, la cual está ampliamente caracterizada a nivel bioquímico y estructural, no puede decirse lo mismo de su isoforma patogénica o PrP^{Sc}, la otra cara de la moneda. Tras un proceso de conversión desconocido hasta la fecha, esta isoforma modifica su estructura terciaria adquiriendo nuevas características bioquímicas y biológicas que conducen a la aparición de la enfermedad priónica.

2.2.1.- Heterogeneidad de la PrP^{Sc}

INTRODUCCIÓN

Tras el postulado de la teoría “solo proteína” por parte de Prusiner en 1982, numerosas investigaciones se orientaron a describir de forma detallada y diferenciar las propiedades adquiridas por la isoforma PrP^{Sc}, tras la conversión de la PrP^C. El resultado es una proteína rica en láminas-β (40% de láminas-β frente al 3% de láminas-β para la PrP^C) que le hace presentar importantes diferencias bioquímicas y biológicas. Esta isoforma resulta insoluble, forma agregados, presenta una resistencia parcial al tratamiento con proteinasas, y es neurotóxica (198). Estas propiedades, principalmente la insolubilidad y la capacidad de agregar y formar amiloides, dificultan el estudio estructural de esta nueva isoforma hasta el punto de que, al contrario que para la PrP^C, no se ha podido determinar su estructura tridimensional, hasta la fecha. Conocer la estructura del agente infeccioso es una condición indispensable para comprender los mecanismos de propagación, la neurotoxicidad y las bases moleculares que definen la barrera de transmisión interespecies y la existencia de diferentes cepas priónicas, así como para diseñar nuevas aproximaciones terapéuticas (199). Este problema no es exclusivo de las EET, ya que el fenómeno de agregación de proteínas y péptidos en una variedad de agregados insolubles juega un papel central en otras enfermedades. En todas ellas, las proteínas adoptan conformaciones estructurales anómalas que dificultan el correcto estudio y resolución de la estructura atómica que forman (200). Estas nuevas conformaciones que se originan no siempre son homogéneas, lo que da lugar al concepto de amiloides polimórficos. Las proteínas que presentan tendencia a formar distintos amiloides reflejan que estas no han sufrido constricciones evolutivas que les hicieran retener una única conformación activa. El plegamiento amiloide es consecuencia de un equilibrio delicado entre diversos estados conformacionales y de la interconversión entre ellos mismos, por lo que está ampliamente aceptado que una misma proteína amiloidogénica puede contener varias estructuras con diferentes núcleos ricos en láminas-β debido a rutas de formación de amiloides alternativas (201). El principal motivo estructural de los agregados amiloides es el motivo lámina-β, lo que sumado al hecho de que los amiloides polimórficos también pueden presentar diferencias macroscópicas, provoca que los espectros obtenidos a través de técnicas como la RMN sean de baja resolución (202). Este concepto de amiloides polimórficos explicaría el fenómeno de cepa en las enfermedades priónicas, ya que está establecida la existencia de agregados de PrP^{Sc} con diferentes características que dan lugar a distintas manifestaciones clínicas. Sin embargo, la heterogeneidad de estas cepas cuestiona en cierta manera la existencia de un único núcleo estructural definido y conservado en todas las PrP^{Sc}, sugiriendo más bien un compendio de variaciones estructurales en la organización de la PrP^{Sc} (203). La posibilidad de que la isoforma patogénica de la proteína priónica no adopte una única conformación, ha hecho que la comunidad científica se replantee la forma de abordar el problema, teniendo en cuenta esta heterogeneidad a la hora de intentar resolver su estructura

INTRODUCCIÓN

tridimensional, valiéndose para ello de técnicas de propagación *in vitro* que podrían ayudar a superar estas limitaciones.

A finales del siglo pasado se produjo por primera vez PrP recombinante purificada a partir de *E. coli* (204), abriendo paso a una de las herramientas más importantes en el campo de las EET, ya que se ha utilizado en prácticamente todas las áreas de conocimiento, desde la investigación básica para tratar de dilucidar los mecanismos moleculares de conversión hasta de forma aplicada para evaluar métodos de diagnóstico o detectar compuestos terapéuticos (205). Utilizando técnicas *in vitro* se reprodujo con proteína recombinante las características biológicas de una PrP^{Sc} determinada y, de la misma manera, se generaron espontáneamente los primeros priones recombinantes que resultaron infecciosos *in vivo* (105, 106). Sin embargo, a pesar de reproducirse *in vitro* las características bioquímicas de cepa o de generar nuevos priones infecciosos, estos acababan por presentar propiedades biológicas dispares al ser inoculados *in vivo*, difiriendo mucho en su capacidad infecciosa (206). Esta heterogeneidad en los conformeros de PrP^{Sc} observada en los resultados *in vitro* derivaría de la propiedad que presentan los amiloides de adoptar diversas estructuras conocidas como amiloides polimórficos. Además, hay que tener en cuenta que los propios sistemas *in vitro* utilizados para el estudio de priones recombinantes pueden ser responsables de esta variabilidad, ya que algunos métodos obtienen productos finales diferentes en función de parámetros como la agitación (207), la presencia de cofactores (208), la temperatura, el pH y otras variables.

En este punto, es necesario matizar que no cualquier tipo de amiloide de PrP puede ser considerado un prion *sensu stricto*, pese a que compartan ciertas características con estos. Para diferenciar ambos conceptos, utilizaremos el término prion *bona fide* haciendo referencia a aquellos priones (recombinantes o de origen encefálico) que presenten las propiedades fundamentales de un prion: características bioquímicas determinadas como la resistencia a proteasas, capacidad para propagar de forma autocatalítica y la inducción de enfermedad *in vivo*. Estos priones *bona fide* son siempre amiloides, pero debemos distinguirlos de aquellos otros amiloides de PrP que presentan únicamente algunas de estas propiedades (como por ejemplo la resistencia a proteasas) y a los que nos referiremos tan solo como PrP^{res}, ya que no podremos considerarlos priones *bona fide* hasta que demuestren su transmisibilidad e infectividad *in vivo*.

2.2.2.- Modelos estructurales de la PrP^{Sc}

INTRODUCCIÓN

Uno de los mayores interrogantes que queda por resolver en el campo de los priones es, sin lugar a duda, la estructura tridimensional de la PrP^{Sc}. Mientras que la estructura de la PrP^C está disponible desde finales del siglo pasado (166), la conformación de la isoforma patogénica sigue siendo desconocida, lo que supone un impedimento a la hora de dilucidar los mecanismos moleculares que rigen la conversión entre ambas isoformas. Como se ha descrito en el apartado anterior, uno de los principales problemas al que se enfrenta la biología estructural en el estudio de los priones, es la heterogeneidad de los agregados de PrP, que supone un escenario dinámico de conversión a polímeros de diferente tamaño y no una única estructura (203). Estos agregados además de ser de alto peso molecular son mayoritariamente hidrófobos, lo que supone la formación de agregados no cristalinos insolubles en detergentes, necesarios para la caracterización estructural a partir de determinadas técnicas biofísicas (209). Debido a que los primeros intentos por resolver la estructura de la PrP^{Sc} se realizaron a partir de muestras encefálicas, se encontraron con problemas como la copurificación de otras proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (210) o la heterogeneidad en los perfiles de glicosilación. A pesar de la revolución que ha supuesto el uso de proteína recombinante para este tipo de estudios (205), muchos de los priones generados *in vitro* no mimetizan de forma exacta el comportamiento de los priones en la naturaleza, a pesar de compartir determinadas características. Hoy en día, superar este inconveniente y encontrar las condiciones ideales para obtener un prion recombinante *bona fide* susceptible de ser estudiado mediante técnicas biofísicas como la cristalografía de rayos X o RMN, sigue siendo uno de los mayores retos en el campo de las EET.

A pesar de estas limitaciones, se han recopilado numerosos datos estructurales durante las últimas décadas principalmente utilizando técnicas de baja resolución y que se han utilizado para proponer modelos teóricos de la estructura de la PrP^{Sc}. Una de las primeras estrategias utilizadas en el estudio de la estructura de la PrP^{Sc} fue la combinación de dicroísmo circular (DC) y FTIR, que reveló una predominancia de motivos de lámina- β en la estructura de la PrP^{Sc}, en comparación con el contenido mayoritario de hélices- α observado en la isoforma no patogénica (81). Una de las propiedades bioquímicas de la PrP^{Sc}, la resistencia al tratamiento con proteasas (58), fue aprovechada para realizar estudios de proteólisis limitada que proporcionaron también información estructural de gran relevancia. Al observar que tras el tratamiento con PK, únicamente se digerían los primeros 90 aminoácidos del extremo N-terminal, y que el producto de la digestión retenía sus propiedades infecciosas (211), se concluyó que el inicio del extremo N-terminal no era esencial para la propagación priónica. Esta afirmación se confirmó mediante el uso de ratones transgénicos que expresaban una PrP^C carente de los primeros 90 aminoácidos (212). No obstante, la heterogeneidad de la PrP^{Sc} supone una importante limitación para

INTRODUCCIÓN

el estudio de la estructura mediante proteólisis limitada, ya que distintas cepas priónicas muestran una resistencia variable ante el tratamiento con proteasas (213). Sin embargo, el hecho de que el sitio de corte de la PK sea diferente según el tipo de cepa que se maneje, aporta también información estructural relevante, sugiriendo que el plegamiento de cada cepa puede variar ligeramente, pudiendo ser útil a la hora de distinguir cepas bioquímicamente (214). Otra de las aproximaciones realizadas fue el mapeo de epítomos mediante el uso de anticuerpos monoclonales, que aportó información sobre la distinta accesibilidad que presentaban las regiones de la fibra de PrP^{Sc}. Estos estudios revelaron una región comprendida entre la posición 90 y la 120 que no era accesible a anticuerpos, mientras que los residuos situados en la región C-terminal mostraron una accesibilidad mucho mayor (215, 216). Las técnicas microscópicas han sido ampliamente utilizadas para el estudio de la ultraestructura de los priones, siendo las primeras en permitir la observación directa de fibras priónicas mediante la combinación de TEM con técnicas de tinción negativa (63). Estas fibras de priones, que en un principio se denominaron “varillas priónicas”, se encuentran en el rango de 10-100 nm de largo y 5 nm de ancho. La microscopía de fuerza atómica (AFM, del inglés *Atomic Force Microscopy*) y el reciente desarrollo de la criomicroscopía electrónica (cryoEM, del inglés, *cryogenic Electron Microscopy*) han supuesto una revolución también para los estudios estructurales de la PrP^{Sc}, ya que permiten una resolución sin precedentes de los agregados de PrP^{Sc}, pudiendo extraerse datos más precisos acerca de motivos estructurales repetitivos (217, 218). Las técnicas de difracción también han sido utilizadas con el objetivo de extraer información estructural de las fibras de PrP^{Sc}. La difracción de rayos X (219), basándose en la dispersión cuasi-simétrica de fibras similares a agregados macromoleculares, ha permitido obtener algunos patrones de difracción de baja resolución, mientras que la cristalografía de rayos X exige la formación de cristales tridimensionales bien ordenados de pequeño tamaño, lo que no ha sido posible hasta la fecha con los agregados de PrP^{Sc}. Por último, la dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS, del inglés *Small Angle X ray Scattering*), puede llegar a proporcionar una medida aproximada del tamaño del agregado (220). Actualmente, junto con la cryoEM, una de las técnicas con mayor potencial en el campo es la RMN, capaz de identificar la ubicación de elementos de la estructura secundaria de agregados de priones cuando se encuentran en solución (221) y su variante, la espectroscopia de RMN de estado sólido (ssNMR, del inglés *solid-state Nuclear Magnetic Resonance*), capaz de determinar de forma fiable la estructura tridimensional de moléculas individuales pertenecientes a fibras de amiloide infecciosas (222). Existen otras modalidades de RMN como la RMN de estado sólido paramagnética o la técnica de intercambio hidrógeno-deuterio acoplada a RMN, las cuales también han permitido obtener datos sobre las áreas o residuos más empaquetados o expuestos de las fibras amiloides de PrP^{Sc} (223, 224).

INTRODUCCIÓN

El uso de todas estas técnicas ha permitido compilar suficientes datos como para que, sobre todo en las últimas décadas, se hayan propuesto varios modelos teóricos acerca de la estructura de la PrP^{Sc}. Sin embargo, la mayoría han ido descartándose casi por completo a medida que se acumulaban evidencias en contra. Uno de los más populares fue el modelo de hélice- β (225), propuesto a partir de datos de microscopía electrónica en 2D que sugerían una estructura de hélice- β levógira y que quedó descartado por los resultados obtenidos con la técnica de difracción de rayos X (226). Otro modelo fue el de espiral- β (227), propuesto por Dagget y colaboradores en 2004 basándose en simulaciones de dinámica molecular de la PrP. A pesar de que esta propuesta coincidía con algunos datos experimentales observados con técnicas de baja resolución, no cumplía con las evidencias obtenidas en experimentos de proteólisis limitada e intercambio hidrógeno-deuterio (209). Aunque dichos modelos no llegaron a definir la estructura tridimensional de la PrP^{Sc}, resultaron útiles para que se propusieran otros modelos teóricos, potencialmente más cercanos a la realidad por coincidentes con los datos experimentales. En el momento en el que esta tesis doctoral se escribe, los dos modelos estructurales más robustos son el modelo de láminas- β paralela en registro (PIRIBS, del inglés *Paralell In-Register Intermolecular β -Sheet*) y el modelo de láminas- β en solenoide de cuatro pisos (4R β S, del inglés *4-Rung β -Solenoid*).

Modelo de láminas- β paralela en registro

Este modelo conocido como láminas- β paralela en registro (PIRIBS), fue propuesto por Surewicz y colaboradores en 2007 (228) y presenta una situación en la que las láminas- β se acumulan dispuestas en registro, lo que permite un crecimiento infinito de las fibras. Este modelo se basó en los experimentos de intercambio de hidrógeno-deuterio acoplado a espectrometría de masas y de resonancia paramagnética electrónica (EPR, del inglés *Electronic Paramagnetic Resonance*), utilizando proteína recombinante humana y también PrP^{Sc} procedente de cerebro (224). Según este modelo, cada monómero de PrP tiene 4.8 Å de tamaño y se apila sobre la anterior en registro, estando cada monómero compuesto únicamente por láminas- β plegadas sobre sí mismas. Este modelo, viene respaldado por datos obtenidos a través de estudios de RMN de estado sólido utilizando proteínas recombinantes o estudios *in silico* de dinámica molecular. Para estos estudios, se utilizaron amiloides de PrP formados espontáneamente o generados a partir de una semilla, lo que sugiere que amiloides de PrP de diferente origen pueden adoptar una conformación similar a este modelo (229, 230). Para evitar las posibles interferencias por parte de algunas de las modificaciones post-traduccionales que sufre la PrP en los estudios de intercambio de hidrógeno-deuterio acoplados a espectrometría de masas, se realizaron experimentos utilizando PrP²⁷⁻³⁰ directamente purificada a partir de encéfalos de ratones sin GPI (231). Otro dato a favor de este modelo

INTRODUCCIÓN

se ha basado en el uso de RMN de estado sólido aplicado a una PrP recombinante Y145Stop (una mutación asociada a GSS) malplegada *in vitro* y que había mostrado infectividad previamente (232). Una de las características en las que se apoya este modelo es la existencia de únicamente de láminas- β y giros cortos que las separan, sin presencia de hélices- α , lo que supone la pérdida total de los motivos estructurales de la PrP^C durante la conversión a PrP^{Sc} (80). Sin embargo, la conformación PIRIBS presenta incongruencias, como la imposibilidad de explicar la presencia natural de hasta dos N-glicanos en la PrP^{Sc}, ya que el alto grado de empaquetamiento que requiere esta estructura no deja espacio libre para estas cadenas laterales de gran tamaño (233). Además, datos obtenidos en experimentos de cryoEM y difracción por rayos X, no respaldan el modelo PIRIBS, ya que apuntan a que los monómeros de PrP^{Sc} tendrían una altura de 19.2 Å, justo cuatro veces más que las que este modelo presenta (218, 226). Por otra parte, sí observan una señal más débil de 10 Å característica del apilamiento de láminas- β (219) y que ha sido detectada en el prion fúngico HET-s bajo determinadas condiciones (234), lo que podría corresponderse con una estructura similar al modelo PIRIBIS y que ha sido descrita en otros amiloides. En el momento en el que se redacta esta tesis doctoral, resulta de especial relevancia la reciente publicación por parte del laboratorio del Dr. Byron Caughey en la que se presenta la estructura tridimensional a nivel atómico de un prion mamífero infeccioso de hámster, resuelta mediante técnicas de cryoEM. Dicha estructura está compuesta por once regiones de láminas β en cada monómero de PrP^{Sc} y cuyos agregados se encuentran formando una estructura de tipo PIRIBS, confirmando sorprendentemente la presencia de este modelo estructural al menos en la cepa de hámster que utilizan para la resolución de la estructura tridimensional (Figura 4 a) (235).

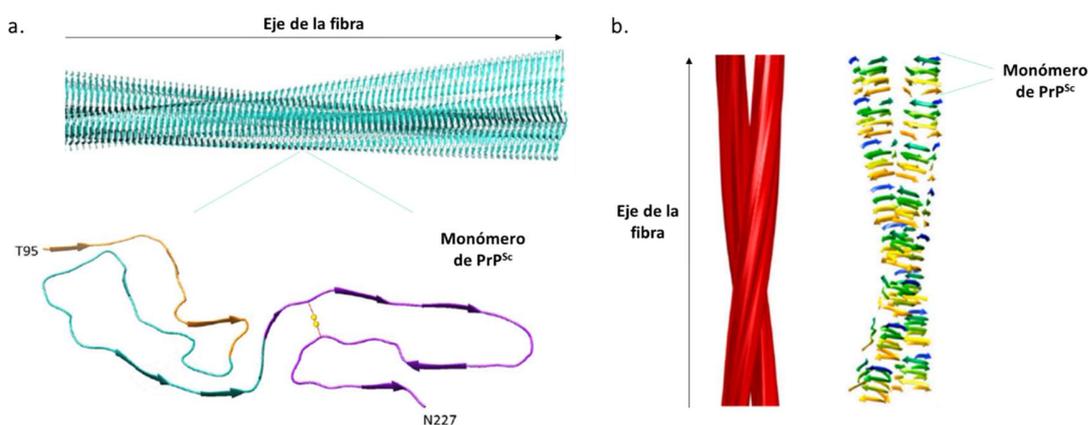


Figura 4. Representación de los dos modelos estructurales con mayor respaldo experimental de las fibras de PrP^{Sc} y los monómeros que los conforman. a) Modelo de lámina- β paralela en registro (PIRIBS). (Modificado de Kraus 021. b) Modelo de láminas- β en solenoide de cuatro pisos (4RBS). Modificado de Wille 2018.

INTRODUCCIÓN

Modelo de láminas- β en solenoide

El modelo de láminas- β en solenoide de cuatro pisos (4R β S, del inglés *4-Rung β -Solenoid*), presenta una estructura tridimensional en la que la PrP^{Sc} está formada por láminas- β enrolladas sobre sí mismas formando un solenoide de cuatro pisos (Figura 4 b). Fue propuesto basándose en los datos obtenidos por cryoEM y la reconstrucción tridimensional (3D) realizada utilizando PrP^{Sc} purificada de ratones transgénicos que expresaban una PrP^C sin GPI y que habían sido infectados con priones murinos obtenidos de animales infectados (218). Cada monómero de PrP^{Sc} se dispondría según este modelo, en forma solenoide formado por cuatro niveles o pisos, cada uno de ellos con una altura de 4.8 Å, correspondiente a cada una de las cuatro vueltas que daría este solenoide formado por láminas- β , dando lugar a una altura teórica de 19.2 Å (4.8 Å \times 4 pisos). Estas evidencias se apoyan a su vez, en datos previos de difracción de rayos X y FTIR, donde se dedujeron unidades repetitivas con valores de 9.6, 6.4 y 4.8 Å, correspondientes con las alturas de los niveles del solenoide (226). Las imágenes obtenidas por cryoEM mostraron fibras de 10 nm de grosor, compuestas a su vez por dos protofilamentos que presentan una torsión hacia izquierda o derecha dejando un espacio entre ambos. En cuanto a la altura de las fibras, obtuvieron valores de 20 Å y 40 Å, que concuerdan con las medidas de una fibra individual (\sim 19.2 Å) y con un ensamblaje mayor de dos monómeros a medida que el protofilamento se extiende en longitud. Esta unión teórica entre monómeros de PrP^{Sc} dentro de una misma fibra podría ocurrir siguiendo la misma orientación (cabeza-cola) o la contraria (cabeza-cabeza y/o cola-cola), siendo imposible de predecir actualmente con los datos experimentales disponibles (236). La señal de 10 Å característica del empaquetamiento de láminas- β y que se observaba en experimentos que condujeron a proponer el modelo PIRIBS, no se detectó en estos experimentos, lo que respalda la conformación de solenoide. Sin embargo, los datos de difracción obtenidos para priones de origen recombinante sí confirmaron la presencia de la señal características de 10 Å relacionada con el modelo PIRIBS, aunque puede deberse a la diferencia entre el origen encefálico y recombinante de los priones (226). La estructura de β -solenoides ya ha sido confirmada mediante RMN de estado sólido para un prion fúngico, el amiloide HET-s que presenta una estructura de β -solenoides de dos pisos y una ausencia de la señal de 10 Å en condiciones normales, además de un contenido aproximado de 53% de láminas- β y un 47% de giros y bucles (237). Este hecho encajaría con los datos históricamente obtenidos a través de FTIR, que mostraban como la PrP^{Sc} seguía presentando un pequeño porcentaje de hélices- α a pesar de su contenido mayoritario de láminas- β en la PrP^{Sc} (80, 81). Debido a que esa señal en la técnica de FTIR asociada a hélices- α solapa parcialmente con la señal característica de giros y bucles, este modelo aboga por una reinterpretación de los resultados, defendiendo la presencia de giros y láminas- β en el solenoide y descartando la existencia de hélices- α (238). De esta manera, el modelo

INTRODUCCIÓN

estaría compuesto por láminas- β enrolladas y que abarcan la región globular del extremo C-terminal de la PrP^{Sc}, proyectando la región flexible del N-terminal hacia el exterior de la estructura. Esta disposición viene asociada con un alto grado de compactación, lo que sería compatible con la elevada resistencia al tratamiento con proteasas, evitándose la degradación de la mayor parte de fibrillas de PrP^{Sc}, pero a su vez, concordando con la pérdida de los primeros 90 aminoácidos de extremo N-terminal. Este modelo se ha utilizado para simulaciones de dinámica molecular (MD, del inglés *Molecular Dynamics*) que presenta la resolución atómica de la PrP^{Sc} murina basándose en la conformación 4R β S. Este modelaje ha confirmado que el modelo de β -solenoides permite acomodar las glicosilaciones de la PrP^{Sc} sin impedimentos estéricos, además de presentar una estabilidad teórica similar a la del prion HET-s. Además de suponer un respaldo adicional al modelo, esta nueva aproximación ha permitido simular computacionalmente por primera vez el mecanismo de propagación de los priones basados en el modelo de β -solenoides (239).

Los modelos de PIRIBS y 4R β S a pesar de sus diferencias, vienen respaldadas por distintos datos experimentales y se consideran actualmente como las opciones más cercanas a la realidad estructural de la PrP^{Sc}. Aunque la gran mayoría de la comunidad científica ha señalado el modelo 4R β S como el más correcto en los últimos años, algunos datos experimentales parecen sugerir que la estructura PIRIBS podría actuar como molde sobre el que más tarde polimerizarían los monómeros de PrP^{Sc} adoptando la configuración 4R β S. Esta posibilidad, sumada a la reciente publicación de Caughey y colaboradores en la que confirman la presencia de una estructura de tipo PIRIBIS al menos en un prion mamífero, podrían incluso llevar a pensar en la coexistencia de ambos modelos según la cepa priónica analizada (199).

2.2.3.-Neurotoxicidad de la PrP^{Sc}

La presencia de depósitos proteicos en el cerebro de pacientes y animales que habían sufrido una enfermedad priónica hizo que se considerasen estas fibras amiloideas como las responsables de la degeneración neuronal. Sin embargo, hoy en día existen evidencias que sugieren una disociación entre el fenómeno de formación de agregados proteicos y la neurotoxicidad, no estando del todo claro el papel de los depósitos de PrP^{Sc} en la muerte neuronal (240). Los primeros estudios que permitieron empezar a explorar la neurotoxicidad en las enfermedades priónicas son los realizados con ratones KO-PrP (180), que llevaron a la conclusión de que la presencia de PrP^C era necesaria para que ocurriera la neurodegeneración, ya que incluso su eliminación condicional de forma postnatal o en modelos previamente inoculados con PrP^{Sc}, fue suficiente para revertir los signos clínicos iniciales y prevenir el curso de la enfermedad en ratones (241, 242). Además, demostraron que la PrP^{Sc} no ejercía ningún efecto

INTRODUCCIÓN

patológico en los ratones sin PrP^C, aparte de ser resistentes a la infección (97). De la misma manera, los experimentos de trasplantes de tejido con PrP^C funcional en ratones KO-PrP, demostraron que, tras la infección con priones, la neurotoxicidad quedaba limitada al tejido que expresaba PrP^C, mientras que la PrP^{Sc} se extendía por todo el cerebro (193). Estos datos apuntaban a que la PrP^{Sc} no era el agente directamente responsable de la neurodegeneración, y que dicho proceso era dependiente de PrP^C. Estudios posteriores precisaron que la neurodegeneración depende no solo de la disponibilidad de PrP^C funcional, sino de su localización en membrana celular, ya que al utilizar ratones transgénicos que expresaban PrP^C sin GPI, se observaba una neurodegeneración más leve, a pesar de acumular grandes depósitos de PrP^{Sc} (231). Por otra parte, la eliminación química del GPI en priones ya formados no disminuyó su capacidad de infección (182), lo que sugiere que este grupo no es esencial para la propagación priónica y la transmisión de la enfermedad, pero sí para los procesos neurotóxicos asociados a ella. La unión del grupo GPI a las proteínas está asociada a diversas funciones, entre las que destaca su papel como transductor de señales debido a su presencia en la membrana plasmática (161). Algunos de los posibles mecanismos de toxicidad propuestos se apoyan en esta hipotética función, ya que se ha observado que la unión entre PrP^{Sc} y PrP^C puede causar daño neuronal en el hipocampo de ratones (243), mientras que otras investigaciones defienden que una interacción entre la PrP^{Sc} y el sistema ubiquitín-proteosoma (UPS, del inglés, *Ubiquitin-proteasome system*) (244) o incluso una respuesta por parte del RER ante el estrés causado por la acumulación de PrP^C en el citoplasma (245) podrían ser los principales mediadores de neurotoxicidad. Debido a que ninguna de estas propuestas ha podido ser demostrada, sigue siendo necesario conocer la función biológica de la PrP^C y la de su grupo GPI en concreto, ya que podrían conducir a un entendimiento más completo de los mecanismos que rigen la neurodegeneración en las EET.

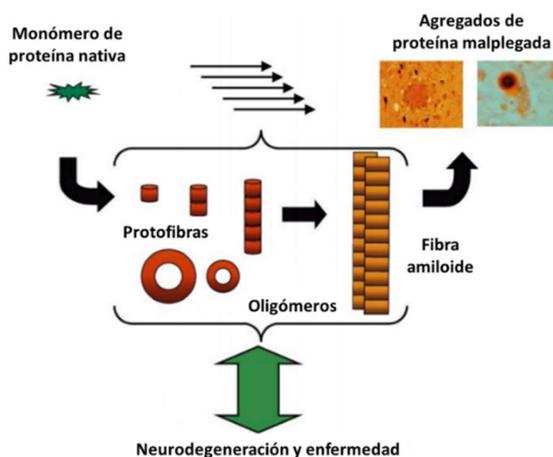


Figura 5. Representación esquemática de la formación de agregados proteicos a partir de proteína en conformación nativa. Ilustración de la formación de grandes agregados proteicos en las enfermedades neurodegenerativas a partir de monómeros de proteína en conformación nativa que malpliegan formando oligómeros de pequeño tamaño que acaban dando lugar a protofibras, fibras amiloides y grandes agregados proteicos y cuyos respectivos roles en los procesos neurotóxicos están en cuestión. Modificado de Caughey 2003.

INTRODUCCIÓN

A pesar de desconocer los mecanismos que desencadenan la toxicidad, cada vez se cuestiona más el papel de los grandes agregados de PrP^{Sc} como agentes neurotóxicos, presentando un escenario alternativo en el que las formas oligoméricas de menor peso molecular son, no solo las mejores inductoras del malplegamiento priónico (246), sino también las especies que presentan propiedades neurotóxicas directamente (Figura 5) (247). Estas evidencias, han hecho que recientemente se consideren estas formas como las responsables de la toxicidad neuronal. Además, mientras que las técnicas de microscopía no son capaces de apreciar diferencias entre diferentes cepas priónicas, los experimentos de velocidad de sedimentación permiten distinguirlas por sus patrones de distribución de tamaño, correlacionando una mayor infectividad y neurotoxicidad con un menor tamaño de los polímeros (248). La posible disociación entre los grandes agregados de PrP^{Sc} y la neurotoxicidad, presenta cierta semejanza a las situaciones que han sido descritas en otras enfermedades neurodegenerativas como la AD o la PD, donde los procesos neurotóxicos siguen sin comprenderse. En el caso de estas patologías, los oligómeros del péptido A β (β -amiloide) para la AD o de la α -sinucleína para la PD parecen desempeñar un papel clave en la neurotoxicidad, como también podría ocurrir en las EET con los oligómeros de PrP^{Sc}. Sin embargo, la manera en la que estos oligómeros de proteína malplegada se generan y polimerizan continúa sin esclarecerse, existiendo distintos mecanismos de propagación teóricos que se discutirán en el siguiente apartado.

2.3.- Mecanismos de conversión

Los mecanismos moleculares que rigen el proceso de conversión de PrP^C a PrP^{Sc} en las enfermedades priónicas siguen siendo desconocidos. Independientemente de la enorme cantidad de información acumulada acerca de la PrP^C y aunque cada vez tenemos más datos sobre la PrP^{Sc}, el evento central de estas patologías, la interconversión entre las dos isoformas, sigue siendo un misterio (153). Una vez se inicia esta conversión y la isoforma patogénica o PrP^{Sc} se encuentra presente, es capaz de inducir ese mismo cambio estructural, a otras moléculas de PrP^C. Este proceso es autocatalítico y culmina con la acumulación de PrP^{Sc} en forma de agregados oligoméricos que a su vez componen fibras amiloides y que, a su vez, pueden organizarse y formar placas en el cerebro de individuos afectados. Estos grandes agregados proteicos, históricamente señalados como responsables de la toxicidad y la patología, podrían desempeñar una función protectora al secuestrar las formas subfibrilares más pequeñas de proteína amiloide, que podrían ser las principales mediadoras de la enfermedad (249). Aunque se desconoce el papel que desempeñan los agregados de PrP^{Sc} de distinto tamaño, sí se sabe que todos ellos presentan

INTRODUCCIÓN

diferencias estructurales y bioquímicas respecto a la PrP^C tras el proceso de conversión. A nivel de estructura secundaria, la PrP^{Sc} presenta un mayor contenido de láminas- β en comparación con la PrP^C, cuyo principal motivo estructural es la hélice- α (81). El cambio estructural conduce a características bioquímicas distintivas entre ambas isoformas, comentadas en apartados anteriores (11, 250). Entre todas ellas, una de las propiedades más explotadas ha sido la resistencia parcial al tratamiento con proteasas que presenta la PrP^{Sc}, lo que permite distinguirla de la PrP^C por su peso molecular (58, 251).

La adquisición de estas nuevas propiedades son fruto de un proceso de conversión del que se desconocen tanto sus mecanismos moleculares como dónde tienen lugar. Debido a que la PrP^C se encuentra anclada a la membrana mediante GPI, algunas investigaciones señalaron que la conversión podría tener lugar en las balsas lipídicas (80). Sin embargo, otros resultados apuntan a que el malplegamiento podría ocurrir en otros compartimentos celulares como las vesículas endosomales u otras localizaciones, que involucrarían diferentes rutas y que implicarían una interacción entre la PrP^C y la PrP^{Sc} (252). Precisamente, se han dedicado muchos esfuerzos a estudiar dicha unión, para caracterizarla y determinar su importancia en el proceso de conversión. Siguiendo esta línea, algunos estudios realizados con ratones transgénicos han proporcionado evidencias de que la conversión de la PrP^C a PrP^{Sc} ocurre a través de la formación de un complejo entre ambas, aunque dicho complejo no ha podido ser aislado (253, 254). A pesar de ello, sí se demostró que la hipotética interacción entre la PrP^C y la PrP^{Sc} se encontraba favorecida cuando las secuencias aminoacídicas de ambas especies eran idénticas y que dicha diferencia era más importante en el proceso de malplegamiento que en la formación del complejo inicial (255). En este apartado se presentan los dos modelos teóricos de conversión más ampliamente discutidos en el campo, además de otras nuevas hipótesis emergentes que se centran en el paisaje energético y cinético del malplegamiento proteico. Estos modelos deben ser capaces de explicar los tres orígenes distintos de las enfermedades priónicas, esporádicas, genéticas o familiares y adquiridas.

2.3.1.- Primeras aproximaciones: modelos teóricos de conversión

2.3.1.1.- Modelo de conversión inducida por molde

Este modelo se basa en la existencia de una interacción directa entre la PrP^C y la PrP^{Sc}, donde la isoforma patogénica actúa como molde induciendo su malplegamiento en la isoforma celular (256). En un estado basal, ambas isoformas se encontrarían separadas por una barrera energética, por lo que la

INTRODUCCIÓN

transformación directa y espontánea de la PrP^C a PrP^{Sc} estaría termodinámicamente desfavorecida según este modelo. Sin embargo, la existencia de diferentes orígenes en las enfermedades priónicas no podría ser fácilmente explicada por este modelo. Por ese motivo, el modelo propone la existencia de un estado transitorio entre ambas isoformas, que se conoce como PrP^{*} y que explicaría los tres orígenes de la enfermedad. En el caso de la variante adquirida, el estado transitorio formaría un complejo con la PrP^{Sc} de origen exógeno, dando lugar a un heterodímero PrP^{*}-PrP^{Sc} que posteriormente induciría ese estado en otras moléculas de PrP^C. Los casos de enfermedad priónica espontánea (de origen esporádico y/o genético) quedarían explicados por la aparición de un evento muy poco frecuente como sería la aparición de un homodímero PrP^{*}-PrP^{*}. Este complejo podría aparecer de manera espontánea o debido a una mutación somática, evolucionando en ambos casos a un homodímero PrP^{Sc}-PrP^{Sc} y originando la enfermedad. La enfermedad de origen genético estaría explicada además por una inestabilidad de la PrP^C debido a las mutaciones en el gen *PRNP* que conducirían a una mayor concentración de PrP^{*} y a la formación del homodímero PrP^{*}-PrP^{*}, lo que aumentaría la frecuencia de aparición del homodímero PrP^{Sc}-PrP^{Sc} (83). Este modelo está respaldado por algunos resultados *in vitro* que confirman la existencia de un estado intermedio entre la PrP^C y la PrP^{Sc}, que podría coincidir con el denominado PrP^{*} (257). Sin embargo, la explicación de que el estado PrP^{*} se origina como un evento aleatorio e infrecuente, no ha convencido a parte de la comunidad científica, que defiende la existencia de un catalizador para este proceso. En un inicio, se le llamó proteína X, pues se defendía que debía tener un origen proteico, pero pronto esta teoría dejó de apoyarse con la generación de priones *in vitro* utilizando componentes purificados y PrP recombinante (106).

2.3.1.2.- Modelo de Nucleación-Polimerización

Este modelo propone que ambas formas de la proteína priónica (PrP^C y PrP^{Sc}) coexisten manteniendo un equilibrio termodinámico reversible donde se favorece la presencia de PrP^C bajo condiciones fisiológicas. La inestabilidad de la PrP^{Sc} monomérica provocaría una lenta formación de agregados más grandes, desplazando poco a poco el equilibrio hacia la formación de PrP^{Sc} a medida que se van añadiendo más unidades de esta isoforma (258). Según esta hipótesis de nucleación-polimerización, el agente infeccioso consiste en un agregado altamente ordenado de moléculas de PrP^{Sc} formado tras desplazar el equilibrio que originalmente favorecía la presencia de PrP^C. De esta manera, el proceso de conversión tendría una primera fase o fase latente en la que se forma un núcleo de PrP^{Sc} de manera lenta, y una segunda fase o fase exponencial donde nuevos monómeros de PrP^{Sc} se sumarían al

INTRODUCCIÓN

núcleo inicial, permitiendo un rápido crecimiento del polímero. Este crecimiento descontrolado se traduciría en la formación de grandes agregados de tipo amiloide que a su vez podrían sufrir fragmentaciones puntuales generando nuevos núcleos de PrP^{Sc} susceptibles de sumar monómeros y aumentar el número de agregados amiloides, acelerando así el proceso. Este modelo teórico explicaría las enfermedades priónicas adquiridas con la entrada de agregados de PrP^{Sc} exógenos al organismo que actuarían como núcleos iniciadores de la propagación. En el caso de las EET de origen esporádico, la formación de los primeros núcleos sería un proceso lento e infrecuente, que se vería acelerado por la presencia de mutaciones que aumentarían la tendencia de la PrP^C al malplegamiento en el caso de las formas genéticas. Si este modelo fuera correcto, la PrP^{Sc} sería la especie minoritaria del equilibrio entre ambas isoformas, pero al ser de expresión ubicua, estaría presente en todo el organismo y difícilmente podría ser considerada como el agente causante de la enfermedad. Esta propiedad quedaría relegada a los agregados de PrP^{Sc}, considerando la PrP^{Sc} monomérica como inofensiva *per se*, pero con el peligro potencial de actuar o bien como iniciador del proceso o bien como unidad agregada a las fibras crecientes de PrP^{Sc}. Algunos modelos matemáticos apoyan el modelo de nucleación-polimerización (259), al igual que determinados estudios *in vitro* que demuestran que los oligómeros compuestos por menos de seis unidades de PrP^{Sc} no son infecciosos en hámster sirio, por lo que refuta la idea de que los dímeros de PrP^{Sc} que postula el modelo de conversión inducida por molde son los responsables de propagar la enfermedad (246). En contra de este modelo existen algunas evidencias detectadas en otras enfermedades neurodegenerativas, como la observación en la AD de que los grandes agregados podrían desempeñar una función protectora en lugar de patogénica (260).

2.3.2.- Hacia nuevas aproximaciones: cinética y dinámica de la conversión

Tras casi 30 años desde su descripción, ninguno de los dos modelos de conversión clásicos ha sido ratificado, debido principalmente a la falta de pruebas bioquímicas y fisicoquímicas concluyentes. Ya en la década de 1990, aparecieron los primeros análisis cinéticos del proceso de conversión desde el punto de vista de cada modelo. Los estudios teóricos de Eigel revelaron que ambos modelos carecían de evidencias fisicoquímicas que los respaldasen, atendiendo sobre todo al evento de polimerización de la PrP^{Sc} (261). De ambos modelos teóricos podía extraerse que la polimerización (o dimerización en el caso de la conversión inducida por molde) juega un papel crucial en el desarrollo de las EET y en la manera en la que un prion es capaz de replicarse e inducir su conformación en moléculas de PrP^C. De esta manera, los primeros estudios cinéticos atendían a la despolimerización de la PrP^{Sc} en hámsteres infectados (262),

INTRODUCCIÓN

revelando que los confórmeros de PrP^{Sc} eran más estables que la forma nativa y dando lugar a modelos que proponían una cinética lineal para la polimerización, otorgando importancia por primera vez al tamaño de los confórmeros iniciales de PrP^{Sc} (263). Se han propuesto modelos híbridos que combinan ambos mecanismos de conversión, ya que los dos pueden ser cinéticamente similares a nivel teórico. Es el caso de la simulación numérica de Rezaei basada en el modelo Finke-Watzky (264) para la polimerización autocatalítica de fibras amiloides (265). El proceso cinético de conversión se estudió atendiendo a perturbaciones que conducían a un incremento en láminas- β , bien en forma de oligómeros o de fibras amiloides. Algunas de estas modificaciones fueron examinadas en los estudios de desplegamiento inducido por hidrocioruro de guanidinio a pH ácido (266) o los relacionados con la conversión de PrP inducida por dodecil sulfato sódico (SDS) (267), que condujeron a que por primera vez se sugiriera que podían coexistir múltiples vías de plegamiento dentro del paisaje cinético de conversión de la PrP (268). Estas aproximaciones fueron importantes para poder estudiar el efecto de algunas mutaciones patogénicas en el malplegamiento y detectar regiones que podrían estar involucradas. Algunos ejemplos son el dominio comprendido por las hélices- $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de la PrP^C, que resulta clave en la obtención de oligómeros iniciadores del proceso (269) o el puente disulfuro formado entre las cisteínas de las posiciones 179 y 214, cuyo estado de oxidación altera la estabilidad térmica de la PrP^C y favorece su conversión y posterior agregación (270).

Todas estas aproximaciones cinéticas que daban lugar a modelos de agregación se constituían basándose en los procesos canónicos de nucleación-elongación-fragmentación enunciados a principios de la década de 1980 (271). Estos postulados se basan en la existencia de un único tipo de ensamblaje estructural, que podría diferenciarse por la distribución de tamaño que presentaban sus moléculas, en función de en qué punto de la cinética lineal de polimerización se encontrasen. Sin embargo, en las últimas décadas se han sucedido una plétora de evidencias que apoyan la heterogeneidad y diversidad estructural de la PrP^{Sc} que da lugar a la existencia de diferentes cepas de priones con propiedades variables que han sido ampliamente descritas en estudios de transmisión (272), cinéticos (273) y bioquímicos (274). Sin embargo, muy pocos modelos matemáticos han tenido en cuenta la coexistencia de múltiples tipos de fibras y diversos tipos de malplegamiento por parte de la PrP, tal y como propusieron Collinge y colaboradores con el concepto de las cuasi-especies o sub-cepas (275). La caracterización de estos tipos de ensamblajes variables de la PrP^{Sc}, que presentan distintos grados de agregación, despolimerización e intercambio cinético, requieren de nuevos modelos y análisis matemáticos (276). Los estudios realizados con la técnica de dispersión estática de luz (SLS, del inglés, *Static light Scattering*) reflejan la aparición de

INTRODUCCIÓN

oscilaciones puntuales durante el evento de agregación de fibras amiloides de la PrP recombinante, que pueden explicarse por una variación en la capacidad de polarización de la muestra, propiedad que depende directamente del tamaño de dichas moléculas. Con el objetivo de describir las reacciones cinéticas que pueden ocurrir en el evento de polimerización/despolimerización, se propuso un modelo matemático aplicando una variante al sistema de Becker-Döring. Este sistema es el punto de partida natural para el proceso de polimerización/despolimerización, ya que considera dos reacciones opuestas: la polimerización a través de adición de monómeros y la despolimerización debido a la pérdida de estos. Sin embargo, este modelo no contempla oscilaciones, ni tiene en cuenta las restricciones estéricas de los grandes polímeros a medida que se forman y no contempla ratios de despolimerización no lineales. En un modelo Becker-Döring no lineal y bi-monomérico, una especie de monómero está implicado en la polimerización y otro en la despolimerización, explicando así las oscilaciones en los experimentos de despolimerización y presentando la posibilidad de un evento no lineal e inducido por monómeros, que serían los únicos agentes que interaccionarían entre las fibras de gran tamaño (277). Este tipo de aproximaciones se basan en datos experimentales extraídos a partir de fibras amiloides de PrP que no siempre tienen las propiedades de un prion *bona fide*, lo que hace que el proceso de conversión modelado pudiera ser muy diferente del que ocurre en la naturaleza. Por otro lado, ninguno de estos modelos tiene en cuenta la propagación de PrP^{Sc} en presencia de una semilla priónica, lo que ha llevado a la aparición de algunas aproximaciones que modelen la cinética de crecimiento fibrilar que podrían ocurrir en técnicas como la PMCA, cuyo producto final (PrP^{Sc}) tiene las características de un prion *bona fide* (278).

Sin embargo, la necesidad de técnicas *in vitro* capaces de generar eficientemente priones *bona fide* sin la necesidad de la adición de una semilla de PrP^{Sc} externa, sería una fuente ideal de datos que podrían ser utilizados para generar nuevos modelos matemáticos. Los datos experimentales y los modelos teóricos deben combinarse con técnicas de simulación computacional que, partiendo de estructuras experimentales de PrP, pueden ofrecer información de alta resolución, simular cambios conformacionales y estudiar el efecto de mutaciones patogénicas (279). Las primeras simulaciones de dinámica molecular (MD, del inglés, *Molecular Dynamics*) realizadas en el campo de los priones, modelaron la conversión conformacional de la PrP^C partiendo de la estructura de proteína recombinante de hámster sirio (280). Desde entonces, se han utilizado cada vez más este tipo de técnicas, a pesar de las limitaciones que también presentan. Las simulaciones de MD actuales son capaces de predecir el movimiento de un sistema molecular a través del tiempo, aunque están limitadas a una escala de tiempo de nanosegundos, por lo que procesos biológicos que ocurran en escalas de tiempo superiores, no podrían ser modelados

INTRODUCCIÓN

correctamente (281). Al no poder proporcionar modelos para descifrar el mecanismo del cambio conformacional, estas técnicas se utilizan para muestrear dos estados; el inicial y el final tras el proceso de conversión, lo que ha conducido a la aportación de más información acerca del mecanismo de conversión que desencadena las EET y la estructura final que podría adoptar la PrP^{Sc} (282).

2.4.- Transmisión de priones

2.4.1.- Vías de entrada y diseminación por el organismo

Uno de los aspectos más importantes en la transmisión de priones, clave en las variantes adquiridas de la enfermedad, es la manera en la que los priones entran al organismo y cómo colonizan determinadas áreas, siguiendo un tropismo selectivo que finaliza con su llegada al SNC. Ha sido ampliamente demostrado que el método más eficaz y rápido de inducir una EET en un modelo animal es mediante la inoculación intracerebral (ic) de priones, pero este evento no representa fielmente lo que ocurre en la naturaleza. Una vía de infección natural es a través de la ruta oral, como se ha demostrado tanto a nivel experimental (283) como históricamente, con la aparición de enfermedades adquiridas como el scrapie (8), el kuru (19), la BSE (284) o la vCJD (285). Otras de las rutas de infección más estudiadas en el laboratorio han sido las inoculaciones intravenosas (iv), intraperitoneales (ip) y subcutáneas, que han mostrado diferente tasa de éxito cuando han sido utilizadas en modelos *in vivo* (286). Sin embargo, los priones pueden ser transmitidos a través de vías menos comunes, como son la inyección intraocular (287), intralingual (288), los trasplantes de córnea (31) e incluso las escarificaciones en la piel (289).

Independientemente de la vía por la que penetren los priones al organismo, exceptuando la inoculación intracerebral, estos deben ser capaces de replicarse en los tejidos periféricos donde se encuentren y diseminarse por el organismo hasta alcanzar el SNC. Los procesos que tienen lugar tras la administración por vía oral han sido ampliamente estudiados debido a que esta ruta es la más frecuente y ha originado las principales formas adquiridas de las EET a lo largo de la historia. Por tanto, tras una infección oral, se observa un rápido incremento de la infectividad priónica en la parte terminal del intestino delgado y tan solo en las primeras dos semanas, la infección se extiende a través de los nervios periféricos hasta invadir el núcleo motor del nervio vago, tal y como se ha descrito en ratones y hámsteres infectados con scrapie (290). La manera en la que el agente infeccioso pasa del tracto gastrointestinal al tejido nervioso periférico, sigue siendo tema de estudio en el campo de los priones, aunque se ha observado que algunas de las células del sistema inmunitario del organismo receptor pueden participar

INTRODUCCIÓN

en la diseminación de los priones (291). Concretamente, hace cincuenta años se observó a través de bioensayos, que los órganos linfoides acumulaban priones tras una infección por vía intracerebral o intraperitoneal (292), y que la expresión de PrP^C era constante en los linfocitos cercanos a estos tejidos (293). Posteriormente, la realización de bioensayos con ratones inmunodeficientes demostró que la deficiencia de linfocitos afecta a la patogénesis de priones periféricos, pero no altera la transmisión de estos al SNC (294). Sin embargo, es indudable que, en el caso de una administración oral de priones, parte de ellos son capaces de llegar a los nervios periféricos tras su paso por el tracto digestivo, fenómeno en el que parecen estar implicadas las placas de Peyer. Estas placas son cúmulos de tejido linfático formados en su mayoría por linfocitos B que recubren el intestino delgado, concretamente en la región terminal donde se acumulan los priones en un primer momento (295). Los linfocitos B presentes en las placas de Peyer median la maduración de otro tipo de células presentes en este tejido, las células M (del inglés, *Microfold Cells*) que, debido a que no secretan enzimas digestivas ni están cubiertas de glicocáliz, son una vía de entrada ideal para muchos microorganismos. Este hecho condujo a la propuesta de que las células M podrían ser un sitio de entrada de priones, donde tendría lugar el transporte transepitelial a través del intestino (296), escenario que se confirmó con posteriores estudios en los que las células M eran suprimidas, inhibiendo así la infección por vía oral (297). Sin embargo, es posible que este transporte no esté mediado únicamente por las células M, ya que hay estudios que señalan a los enterocitos del intestino delgado como responsables de esta función (298), utilizando mecanismos dependientes de ferritina o a través de endocitosis mediada por la unión al receptor de laminina (299, 300). Tras la captación de la PrP^{Sc} por parte de las placas de Peyer, comienza una segunda fase de replicación y propagación que involucra nervios periféricos y células dendríticas foliculares. Estas células dendríticas se localizan en el interior de las placas de Peyer, contactan con las células M y adquieren antígenos procedentes de la luz intestinal para transportarlos a los nervios periféricos, lo que podría facilitar el proceso de neuroinvasión (301), tal y como sugiere la acumulación de este tipo de células tras la infección con scrapie en ratones (302). Para completar el proceso de neuroinvasión, la PrP^{Sc} debe alcanzar el SNC diseminándose en dirección retrógrada a través de las fibras nerviosas del sistema simpático y parasimpático (303). La ablación química de ciertos nervios conduce a un retraso o prevención del transporte de priones desde los órganos linfáticos a la médula espinal, sitio de acceso al SNC. Por el contrario, ratones transgénicos con una inervación aumentada en sus bazos, mostraron una gran acumulación de priones en este órgano y un periodo de incubación más corto tras ser inoculados con scrapie (304). De la misma manera, además de la cantidad de tejido nervioso periférico disponible, la distancia existente entre las terminaciones nerviosas y las células dendríticas es un factor condicionante

INTRODUCCIÓN

de la neuroinvasión (305). El mecanismo por el cual la PrP^{Sc} es capaz de abandonar las células dendríticas para dirigirse a las terminaciones nerviosas se desconoce, si bien no existen evidencias que sostienen varias hipótesis diferentes. La primera de ellas es mediante un contacto directo entre células (306), aunque resulta poco probable que el agente infeccioso se transmita de esta manera, ya que estas dos células ocupan distintos sitios anatómicos, encontrándose bastante separados y haciendo que los contactos entre ellas sean muy puntuales (307). Este hecho conduce a la hipótesis de que existe una transferencia intercelular mediada por exosomas, ya sea directamente desde las células dendríticas o a través de intermediarios como los macrófagos (308). Otra posibilidad es la difusión de las formas oligoméricas o protofibrilares de la PrP^{Sc} de forma libre a través del medio extracelular (309). Independientemente del mecanismo que los priones utilizan para alcanzar las terminaciones nerviosas, la forma en la que son transportados desde los nervios periféricos hasta las neuronas del SNC también se desconoce. Teniendo en cuenta la lentitud de la propagación neuronal observada en ciertos estudios (310), una de las hipótesis defiende el transporte secuencial de PrP^{Sc} a través de los nervios, induciendo el malplegamiento de forma sucesiva en las moléculas de PrP^C de la superficie de las células nerviosas. Otras hipótesis apuntan al tránsito de priones por los axones nerviosos periféricos siguiendo un transporte de tipo retrógrado que podría involucrar mecanismos asociados a microtúbulos (123).

A lo largo de estas décadas se ha demostrado que el sistema inmunitario tiene un papel indispensable en la adquisición y diseminación de priones, aunque los mecanismos que la PrP^{Sc} utiliza para evitar su vigilancia, siguen sin conocerse. La expresión ubicua de la PrP^C es un factor para tener en cuenta, ya que podría ayudar a evadir la acción del sistema inmunitario, aunque no se encuentre en su conformación patogénica. Por otra parte, se cree que el alto nivel de empaquetamiento que presentan los oligómeros de PrP^{Sc} puede enmascarar los epítomos conformacionales que la distinguen de la PrP^C y que deben ser reconocidos por las células inmunitarias (311). Además de la heterogeneidad que la PrP^{Sc} puede presentar en cuanto al tamaño de sus confómeros, la existencia de múltiples cepas dificulta aún más el entendimiento del transporte neuronal, pero a su vez proporciona una herramienta con la que poder distinguirlos, ya que muchas de estas cepas utilizan mecanismos diferentes para llegar al SNC (312). Un ejemplo de este fenómeno se encuentra en las cepas HY y DY que, pese a tener un origen común, presentan distintas propiedades de neuroinvasión (313). La adquisición de más información acerca de la manera en la que los priones se diseminan por el organismo y colonizan ciertos órganos de manera selectiva, proporcionaría un mejor conocimiento sobre el fenómeno de cepa, uno de los aspectos más relevantes de las EET y en el que profundizaremos a continuación.

INTRODUCCIÓN

2.4.2.- Barrera de transmisión y fenómeno de cepa

En el campo de la investigación priónica, el término cepa corresponde a una población de priones definida y aislada de un animal específico, con respecto a una serie de características distintivas básicas y a parámetros bioquímicos cada vez más precisos que permiten la discriminación de cuasi-especies dentro de un grupo de conformeros (314). Por tanto, las distintas cepas priónicas pueden definirse como aislados infecciosos que, al ser transmitidos a hospedadores singénicos en condiciones fijas y controladas, induce en ellos fenotipos distintos de la enfermedad (315). Este concepto resultó en un argumento en contra de la teoría “solo proteína”, ya que la existencia de diferentes cepas capaces de variar las características biológicas de un agente infeccioso no se concebía sin la existencia de cambios en su material genético (44). Sin embargo, evidencias experimentales posteriores comenzaron a arrojar algo de luz al fenómeno de cepa priónica, apuntando a la existencia de distintos conformeros estructurales de PrP^{Sc} que compartían una misma secuencia aminoacídica (316). Así, las diferentes cepas de priones pueden clasificarse atendiendo a las características que presentan *in vivo*, como los signos clínicos que producen, el tiempo de incubación o el perfil histopatológico de lesiones (propiedades biológicas) (317); pero también en función de sus propiedades bioquímicas, como son la resistencia a la digestión por PK, la velocidad de sedimentación, el patrón de glicosilación de la PrP^{Sc} y la resistencia a la desnaturalización por agentes caotrópicos (propiedades bioquímicas), que derivan indudablemente de diferencias conformacionales (318). Una de las características distintivas más relevantes de las cepas priónicas, es su capacidad de superar la barrera de transmisión entre especies y provocar la enfermedad en un huésped distinto al de origen. Este fenómeno conduce a que el concepto de cepa priónica y el de barrera de transmisión hayan sido estudiados conjuntamente a lo largo de la historia. Englobamos bajo el nombre de barrera de transmisión a todo fenómeno o característica de los priones que resulte en una transmisión restringida de los mismos. Actualmente, este concepto no se limita únicamente a la capacidad de transmisión entre especies, sino que incluye toda propiedad distintiva de las cepas que dificulte la propagación de un prion entre individuos. Esta barrera hace referencia a la dificultad que presentan algunas cepas de priones para transmitirse a una especie diferente de la que proceden, traducándose en una prolongación del tiempo de incubación y/o una tasa de ataque incompleta, es decir, que no todos los animales inoculados desarrollan la enfermedad (319). La obtención de una tasa de ataque incompleta es habitual en una primera infección de priones que incluye dos especies diferentes, obteniendo periodos de incubación más largos que cuando la transmisión tiene lugar en individuos pertenecientes a la misma especie. En inoculaciones posteriores dentro de la misma especie, se observa una reducción del periodo

INTRODUCCIÓN

de incubación, hasta que finalmente la cepa priónica en cuestión se adapta a la nueva especie, fenómeno que se confirma mediante el análisis de propiedades biológicas y anatomopatológicas (320).

Este amplio concepto de barrera de transmisión es fruto de un largo recorrido histórico, paralelo al descubrimiento del origen proteico del agente infeccioso, que comienza con el uso del término barrera de especie. Desde que Cuillé y Chelle hicieran referencia a la transmisibilidad del scrapie entre ovejas (8), el siguiente punto de estudio fue la capacidad de ciertos priones para transmitirse a individuos de otras especies distintas de la originaria, siendo Gajdusek y colaboradores los pioneros con sus investigaciones a lo largo de la década de 1960 (26, 29). Durante los años posteriores, la comunidad científica se dedicó a estudiar el fenómeno de barrera de transmisión de forma experimental atendiendo a su comportamiento en otras especies, principalmente primates, donde se realizaron experimentos para transmitir la CJD a monos de cola cortada, monos ardilla y monos rojos entre otros, relacionándola con otras EET humanas como el kuru, pero sin detectar la presencia de distintas cepas de priones (321, 322). Gracias a estos primeros estudios que perseguían desentrañar los mecanismos que regían la barrera entre especies, se describió por primera vez la existencia de distintas cepas priónicas, observando dos comportamientos distintivos (*drowsy* y *scratching*) en cabras que habían sido inoculadas con aislados de scrapie (43). Aunque estos estudios demostraron que la barrera existente entre ciertas especies podía ser superada al menos en condiciones de laboratorio, la naturaleza no tardó en demostrar que también podía darse sin intervención humana, con la aparición de enfermedades priónicas animales que podían afectar a especies distintas de las originarias. Un ejemplo de ello fue la TME (323), cuyo origen sigue siendo tema de debate entre la comunidad científica, aunque todo apunta a que los brotes ocurridos en Wisconsin fueron debidos a la alimentación de visones con piensos y carnes contaminadas con proteínas animales. En aquel caso, los animales nunca fueron alimentados con piensos de origen ovino, pero sí con alimentos que contenían proteínas de vaca y caballo (324). Otro ejemplo de origen incierto es la CWD, que apareció en ciervos mula cautivos en unas instalaciones de Colorado (Estados Unidos) en las que existían casos de scrapie en ovejas en el momento de la detección de los primeros casos (325). Aunque ninguna de estas enfermedades ha demostrado la capacidad de cruzar la barrera de especie a humanos hasta la fecha, la EET popularmente llamada “mal de las vacas locas”, supuso la demostración definitiva de la capacidad zoonótica de los priones causando una grave crisis epidemiológica a finales del siglo pasado. La Encefalopatía Espongiforme Bovina (BSE), fue descrita por primera vez en una granja del sur de Inglaterra en 1985, cuando nueve vacas mostraron los mismos signos clínicos en tan solo un año. El análisis histopatológico de los cerebros de estos animales mostró una gran similitud con los afectados por scrapie,

INTRODUCCIÓN

sugiriendo un origen común que ha sido recientemente respaldado por investigaciones que apuntan a una cepa atípica de scrapie (Nor98) como responsable de la aparición de BSE, ejemplificando la estrecha relación entre los conceptos de cepa y barrera de transmisión (116, 326). Independientemente de su origen, la razón de que dicha enfermedad se detectase a partir de 1985 en Reino Unido fue consecuencia de los cambios producidos en los piensos para alimentar al ganado bovino (MBM, del inglés, *meat-bone-meal*). En primer lugar, el uso de estos piensos fabricados a partir de harinas cárnicas pasó del 0% en 1972 al 75% en 1988. Este cambio, aunque gradual, fue sumado a la abrupta disminución del uso de solventes en el proceso de extracción para abaratar los costes de producción, pasando de un 100% a un 50% entre 1980 y 1983 (327). Como consecuencia de la irrupción de esta enfermedad bovina y con intención de proteger la salud pública, en 1989 se prohibió tanto el uso de harinas cárnicas procedentes de rumiantes para alimentar a rumiantes como la inclusión de tejidos de ganado bovino con alta carga del agente causal. Estas medidas resultaron tardías ya que poco después, alrededor de 1995, se diagnosticó el primer caso de vCJD en un adolescente británico y al año siguiente, aparecieron cuatro casos en pacientes más jóvenes que mostraban una patología atípica. La juventud de los individuos afectados, junto al largo periodo de incubación y las diferencias histopatológicas con la CJD clásica, llevaron a que esta nueva versión se denominase variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vCJD) y pudiese ser relacionada etiológicamente con la BSE (328). Esta cepa priónica bovina superó otras barreras de especie aparte de la humana, destacando la aparición de la Encefalopatía Espongiforme de Ungulados Exóticos en rumiantes exóticos de la familia *Bovidae* en zoológicos británicos durante el periodo de actividad de la BSE (329). En esa misma época se reportaron, además, los primeros casos de FSE, que se distribuyeron en el Reino Unido desde 1990 hasta 2000, coincidiendo con la disminución de casos de BSE. Las similitudes bioquímicas e histopatológicas apoyaron a que pudo ser otro caso de superación de la barrera entre especies, y que la BSE se transmitió a los gatos domésticos a través de productos alimenticios contaminados, tal y como apoya la detección de casos en otras especies de la familia *Felidae* que consumieron carne de origen bovino en el Reino Unido (330, 331).

Aunque los fenómenos de barrera de transmisión y cepa comenzaron a estudiarse en primates, ovejas y cabras, muy pronto se intentó transmitir estos aislados naturales de priones a animales de experimentación más manejables. Ejemplo de ello fue la adaptación a ratones, de forma casi paralela, tanto de un aislado natural de scrapie de oveja Suffolk como el aislado de cabra *drowsy*, dando lugar dos de las cepas murinas más utilizadas en la actualidad, las cepas ME7 (46) y RML respectivamente (47). Estas cepas murinas comenzaron a utilizarse para evaluar de forma empírica las barreras existentes en otros

INTRODUCCIÓN

animales, incluyendo ratas, cobayas, conejos y hámsteres sirios. Fue de esta manera como se generó en hámster sirio otra de las cepas más utilizadas en el campo de los priones, el scrapie 263K, previa adaptación mediante pases seriados en rata (87, 332). El hámster sirio pasó a ser un modelo muy utilizado, como demuestra también la adaptación en dicho roedor de dos cepas originadas en el brote de TME de Wisconsin de 1985 mencionado anteriormente. Tras su inoculación se observó cómo algunos hámsteres mostraban una sintomatología nerviosa y de alta excitabilidad, mientras que otros adoptaban un comportamiento letárgico y de baja actividad. Estos dos comportamientos, muy similares en su descripción a los observados por Pattison y Millson en ovejas, fueron mantenidos mediante inoculaciones seriadas en hámsteres hasta dar lugar a dos de las cepas más estudiadas en el campo de los priones (denominadas en inglés *Hyper* y *Drowsy*), que mostraron diferentes comportamientos atendiendo a su coeficiente de sedimentación y a su resistencia al tratamiento con agentes desnaturalizantes (213, 333). Hasta este momento, las cepas priónicas se habían distinguido únicamente por sus propiedades biológicas, por lo que la utilización de técnicas biofísicas y bioquímicas que permitían diferencias dichas cepas gracias a características bioquímicas como su movilidad electroforética y su resistencia al tratamiento con PK supuso un gran avance (334). A pesar de su origen común y de su secuencia aminoacídica idéntica, estos dos aislados eran claramente distintos, fenómeno que los autores atribuyeron por primera vez a posibles diferencias estructurales entre ambas cepas. Sin embargo, en esos momentos el campo de los priones centraba sus esfuerzos en demostrar que la barrera de especie residía principalmente en las diferencias existentes en la estructura primaria de la PrP de dos especies. La presencia de polimorfismos naturales en la PrP de una misma especie fue utilizada por los investigadores para señalar la importancia de la secuencia en la transmisibilidad entre especies. Este es el caso de la distinta susceptibilidad que presentan los ratones de genotipo *a* y genotipo *b*, cuyas PrP difieren en dos residuos aminoacídicos y muestran tiempos de incubación dispares en función de la cepa priónica inoculada (335), o los diversos polimorfismos que aparecen en las secuencias de PrP ovina y que suponen una mayor o menor susceptibilidad a la infección por scrapie clásico, siendo los ejemplares con el polimorfismo VRQ (Val136 – Arg154 – Gln171) más susceptibles a la enfermedad y los que expresan el ARR más resistente (Ala136 – Arg154 – Arg171) (157). Este tipo de variaciones polimórficas se han descrito en una amplia variedad de mamíferos (336), siendo de especial interés la diferente susceptibilidad en humanos a padecer CJD, tanto en su forma esporádica como en su variante adquirida, en función del polimorfismo del residuo 129 de la PrP (118, 120).

INTRODUCCIÓN

La generación de ratones transgénicos que expresaban una PrP exógena sirvió para desarrollar numerosas investigaciones que apoyaban la existencia de una barrera polimórfica que regía la transmisión entre ciertas especies. Algunos de estos estudios confirmaron barreras polimórficas previamente descritas, como la relación entre la diferente susceptibilidad a scrapie ovino y ciertas posiciones de la PrP de oveja (337) o para comprender otras como la existente entre hámster y ratón (317). Estos enfoques fueron más versátiles, como los experimentos realizados con ratones que expresaban la PrP de hámster manteniendo la expresión de la PrP endógena murina. Estos estudios de coexpresión demostraron que se formaban agregados de PrP^{Sc} de ratón cuando se inoculaban priones murinos y agregados de PrP^{Sc} de hámster cuando los ratones recibían priones de hámster (253). Esta observación llevó a la generación de animales transgénicos que expresaban distintas PrP quiméricas, compuestas de partes concretas de la PrP de ratón y de hámster. Gracias a estos animales observaron que los ratones que diferían más en su secuencia respecto a la original de ratón eran más susceptibles a los priones de hámster, pudiendo señalar incluso posiciones concretas de posible interés dentro de la estructura primaria (338). Estas observaciones llevaron a establecer la importancia que la secuencia de la PrP hospedadora tenía en la susceptibilidad a EET, pero también que la adquisición de nuevas propiedades por parte de la cepa puede ocurrir tras superar ciertas barreras de transmisión. Un ejemplo de alteración de propiedades se encontró durante la adaptación a través de inoculaciones seriadas de la CWD de cérvidos en hurones. Los priones de cérvido no son capaces de infectar de forma directa a los hámsteres, pero sí tras su adaptación en hurón mediante pases seriados, donde los períodos de incubación van acortándose hasta alcanzar una estabilización (339). El estudio *in vivo* de estos fenómenos de adaptación se ha visto facilitado desde que la PrP^C del topillo rojo (*Myodes glareolus* o en inglés, *Bank vole*) fue propuesta como la proteína aceptora universal de priones, lo que hace que ratones transgénicos que sobreexpresan la PrP^C de esta especie sean susceptibles a una amplia variedad de aislados priónicos procedentes de diferentes especies (Figura 6 b) (340).

Con el objetivo de estudiar el fenómeno de barrera de transmisión de forma más rápida que mediante el uso de animales transgénicos, algunos laboratorios desarrollaron sistemas basados en células. Aunque estos resultaron ser difíciles de implementar como modelos persistentemente infectados por priones y, además, no permitían la propagación de todo tipo de priones, sirvieron para adaptar algunas cepas priónicas y seleccionarlas *in vitro* (341). Finalmente, se pudieron estabilizar las características de priones adaptados a células y diferenciarlas de las características de priones adaptados a cerebro, observando la aparición de una "selección darwiniana" que parecía regir la transición de una cepa a otra. Aplicando el concepto de cuasi-especies propuesto por Collinge (275), determinaron que un

INTRODUCCIÓN

cambio de condiciones puede dar como resultado a la selección de una nueva variante que adquiera diferentes características y cuyo comportamiento ante la barrera de transmisión sea completamente distinto (Figura 6 a) (342).

Por tanto, aunque sigan utilizándose, los modelos celulares presentan ciertas dificultades para su uso en el estudio de la barrera de transmisión. Posteriormente comenzaron a utilizarse ensayos libres de células para estudiar el fenómeno de barrera de transmisión, adaptando inicialmente dos cepas clásicas de hámster con distintas propiedades a proteína recombinante de hámster y distinguiendo mediante pruebas bioquímicas la cepa HY (del inglés *Hyper*) de la DY (del inglés *Drowsy*) (112). A medida que este tipo de modelos *in vitro* fueron desarrollándose, muchas investigaciones se centraron en la barrera existente entre ratones y hámsteres, previamente estudiada *in vivo* y donde encontraron tres aminoácidos candidatos a ser críticos para la barrera entre estas dos especies (343). La aparición de la PMCA, otra técnica que supuso una gran mejora en la propagación de priones *in vitro*, permitió mantener *in vitro* las propiedades de las cepas adaptadas, resultando una herramienta muy útil para el estudio de la barrera de transmisión (344). Esta metodología permitió ampliar el conocimiento de barreras previamente testadas, como la existente entre hámster y ratón (345) o estudiar otras nuevas, como fue el caso de la adaptación cepas murinas a PrP de cérvido (346).

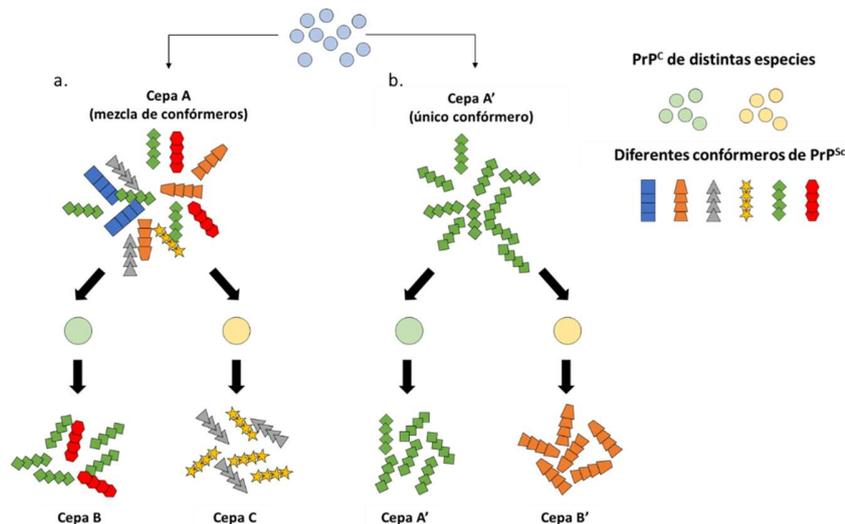


Figura 6. Modelos de emergencia de nuevas cepas priónicas tras la superación de barreras de transmisión. a) Fenómeno de selección. Ante una mezcla de conformémeros inicial que constituyen la cepa A, la propagación a expensas de PrP^C diferentes podría modificar las proporciones de conformémeros iniciales llevando a nuevas mezclas de cuasi-especies que se encontraban en minoría y dando lugar a cepas nuevas con distintas características respecto a la cepa original. **b)** Fenómeno de adaptación. Ante una cepa priónica constituida por un único conformémero, la propagación a expensas de PrP^C distintas podría darse una modificación conformacional en el nuevo hospedador, dando como resultado la adquisición de nuevas características o bien el mantenimiento de sus propiedades bioquímicas y biológicas iniciales si la PrP^C del nuevo hospedador puede acomodar la estructura del conformémero original. Cabe destacar que los procesos de adaptación y selección no son mutuamente excluyentes y por tanto podrían darse de forma conjunta en el caso de que las cepas estuviesen constituidas por mezclas de conformémeros. Basado en Collinge 2007.

INTRODUCCIÓN

La necesidad de otras técnicas que ayuden a interpretar el conocimiento acerca de la barrera de transmisión y el fenómeno de cepa obtenido *in vivo* e *in vitro*, ha llevado al auge en los últimos años de los modelos de estudio *in silico*. Basándose en observaciones experimentales recogidas a lo largo de décadas, estos estudios computacionales suponen un gran avance en el estudio de las barreras de transmisión, ya que podrían ayudar a identificar regiones concretas de la PrP que, al sufrir cambios estructurales, provocasen una variación en sus propiedades, permitiendo localizar los hipotéticos orígenes de distintas cepas priónicas y comprender los mecanismos moleculares subyacentes. Algunos estudios filogenéticos sirvieron para apoyar el origen común de la BSE y la vCJD, identificando el antecesor común entre homínidos y vaca (347). Las secuencias de estas dos especies, comparadas con las de otros muchos mamíferos demostraron una gran similitud, aunque también revelaron que algunas regiones del extremo C-terminal permitían la presencia de numerosos cambios puntuales (148). Dichos cambios se concentran en determinadas regiones como en el lazo que separa la lámina- $\beta 2$ de la hélice- $\alpha 2$ ($\beta 2$ - $\alpha 2$), y apuntan a esta región como una zona de alta diversidad de secuencia para cérvidos (348), equinos (349) y lepóridos (350), pudiendo ser clave en la barrera entre especies (351). El uso coordinado de modelos *in silico* e *in vivo* para determinar las propiedades que rigen la transmisión entre especies resulta fundamental ya que ambos enfoques pueden resultar complementarios. La resolución estructural de las PrP^C de otras especies permitió identificar en la región $\beta 2$ - $\alpha 2$, cuatro aminoácidos cargados que diferían entre la PrP felina y la de los cánidos, pudiendo encontrarse en dichos cambios la resistencia de los perros a sufrir BSE (174), como posteriormente se confirmó con estudios *in vitro* e *in vivo* que apuntaban a la presencia de ácido glutámico en la posición 163 de su secuencia (352, 353). Encontramos un ejemplo similar en la PrP^C de conejo, donde la combinación de estudios de RMN (354, 355) e investigaciones *in vitro*, permitió señalar regiones clave responsables de la baja susceptibilidad de esta especie a la enfermedad por priones (175).

Estos estudios plasman la importancia de combinar distintos enfoques para comprender mejor los fenómenos tan complejos de cepa y de barrera de transmisión. Ambos conceptos han sido estudiados hasta ahora de forma empírica, generando conocimiento experimental a lo largo de las décadas. Estas investigaciones han conducido a la revisión del concepto original de barrera de especie, centrado únicamente en las diferencias puntuales aminoacídicas, para redefinirlo como barrera de transmisión, término más completo que hace referencia a la compatibilidad estructural entre PrP^{Sc} y PrP^C. Este

INTRODUCCIÓN

fenómeno hace referencia a un proceso que aún desconocemos a nivel molecular que está codificado en parte en la estructura tridimensional de cada PrP^{Sc}, conformación que hasta ahora permanece desconocida para la comunidad científica. A su vez, la heterogeneidad mostrada por la PrP^{Sc} se traduce en la existencia de diferentes cepas priónicas, que pueden adquirir potencialmente nuevas propiedades y dificultar el estudio de estos fenómenos. Este escenario hace completamente necesario el desarrollo de nuevos sistemas que permitan un estudio robusto del fenómeno de malplegamiento de la PrP^C y su relación con el surgimiento de cepas priónicas capaces de superar distintas barreras de transmisión.

3.- Modelos experimentales para la propagación y el estudio de priones

Uno de los mayores retos en el campo de la investigación priónica es la obtención de sistemas y modelos que mimeticen fielmente las características de las enfermedades priónicas. Como hemos mencionado con anterioridad, los primeros modelos utilizados para investigar las EET fueron primates (26) y pequeños rumiantes como ovejas y cabras (43). Sin embargo, debido a los largos periodos de incubación, los costes de manutención y otras razones éticas, la experimentación con este tipo de mamíferos empezó a reducirse surgiendo otros modelos como alternativa. El desarrollo de ratones transgénicos marcó un antes y un después en el campo de los priones, facilitando todos los estudios relacionados con la transmisión de estos agentes, particularmente desde la irrupción del topillo rojo (*Bank vole*) como aceptor universal de EET (340). A pesar del avance que supuso el uso de ratones transgénicos, las enfermedades priónicas presentan largos periodos de incubación, lo que dificulta su estudio *in vivo*. Con el objetivo de estudiar este fenómeno de transmisión de forma más rápida que mediante el uso de animales transgénicos, algunos laboratorios desarrollaron sistemas basados en cultivos celulares. Desde la infección exitosa de la línea celular de neuroblastomas de ratón N2a con la cepa priónica murina RML (356), surgieron diversos enfoques destinados a resolver algunos de los enigmas que rodean a las EET. De esta manera muchas investigaciones se centraron en estudiar el fenómeno de barrera de transmisión (357), la propagación de diferentes cepas en cultivos celulares (358), los mecanismos que participan en la propagación y neurotoxicidad de los priones (359) o el testado de compuestos con actividad anti-priónica (360).

Estos estudios *in cellula* antecedieron a diversos sistemas *in vitro* que permitieron reducir el tiempo y los costes asociados a los experimentos realizados con modelos animales y celulares. Sin embargo, aunque estos sistemas de propagación *in vitro* permiten el estudio de algunos aspectos de la patología

INTRODUCCIÓN

priónica, los modelos animales continúan siendo necesarios para la validación de las características clínicas y neuropatológicas. Un ejemplo de ello es la comprobación de las propiedades bioquímicas y biológicas de un prion *bona fide* que, independientemente de su origen recombinante o encefálico, debe ser capaz no solo de propagarse mediante sistemas *in vitro* sino causar también patología priónica *in vivo*. Por ello, el desarrollo de esta tesis doctoral se ha basado principalmente en el uso de técnicas *in vitro*, complementados con estudios *in vivo* que han permitido una caracterización precisa de priones recombinantes. Describiremos detalladamente algunos de los sistemas *in vitro* más utilizados en las últimas décadas en el campo de las EET, centrándonos en el más reciente y sobre el que pivota la mayor parte de los estudios que componen esta tesis doctoral; la amplificación de proteínas malplegadas por agitación (PMSA, del inglés *Protein Misfolding Shaking Amplification*).

3.1.- Primeros métodos de propagación de priones *in vitro*

Con el objetivo de eliminar la variabilidad que presentaban los cultivos celulares y superar limitaciones como la imposibilidad de utilizar diferentes cepas priónicas, comenzaron a desarrollarse sistemas *in vitro* que mimetizaban el proceso de malplegamiento que ocurre *in vivo*. El primero de estos sistemas fue el ensayo de conversión libre de células (del inglés, *cell-free conversion assay*), desarrollado por Caughey y colaboradores a principios de los noventa, basándose en la purificación de PrP^C y PrP^{Sc} a partir de cultivos celulares y encéfalos de animales infectados respectivamente. Tras el marcaje radioactivo de la PrP^C, esta se ponía en contacto con PrP^{Sc} previamente desnaturalizada y re-naturalizada y se inducía su malplegamiento (361). Esta técnica fue un gran apoyo a la hipótesis “solo proteína” y facilitó las investigaciones sobre la barrera de transmisión, la especificidad de cepa (112) y el mecanismo de acción de distintos compuestos con acción anti-priónica (362). Sin embargo, las principales desventajas de esta técnica eran, la laboriosa obtención de PrP^C y PrP^{Sc} purificadas, la necesidad de grandes cantidades de estas y su bajo rendimiento a la hora de malplegar PrP^C, obteniendo además productos no infecciosos que no podían ser considerados como priones *bona fide* (363).

Años más tarde, este mismo grupo de investigadores desarrolló la técnica de conversión inducida por agitación en tiempo real (RT-QuIC, del inglés *Real Time – Quaking Induced Conversion*). Este método *in vitro* utiliza agitación como fuente de energía, proteína recombinante y Tioflavina T (ThT, del inglés *Thioflavine T*), compuesto cuya intensidad de fluorescencia aumenta al unirse a amiloides, permitiendo monitorizar la formación de este tipo de fibras en tiempo real (364). Es una técnica extremadamente sensible y rápida, lo que la convierte en el sistema idóneo para la detección de priones en todo tipo de

INTRODUCCIÓN

muestras biológicas, como líquido cefalorraquídeo (365) u orina (366) entre otros (367, 368). Además de su alta sensibilidad, su especificidad cercana al 100% hace que su uso sea cada vez más frecuente en la práctica clínica como herramienta diagnóstica, no solo para EET, sino que está extendiéndose a la detección de otras enfermedades neurodegenerativas relacionadas con el malplegamiento proteico (369). No obstante, aunque se trata de una importante herramienta para la detección de priones y para el diagnóstico de enfermedades priónicas, las fibras amiloides producidas no son infecciosas, lo que limita la utilidad de la técnica para otro tipo de estudios de infectividad o estructurales (370).

3.2.- Amplificación cíclica de proteínas malplegadas: PMCA

Los esfuerzos por mejorar el ensayo de conversión libre de células y conseguir un sistema *in vitro* capaz de malplegar PrP^C a partir de PrP^{Sc}, condujeron al desarrollo de una nueva técnica capaz de obtener priones *bona fide* mediante el uso de sonicación. Esta demostración supuso el desarrollo de la técnica PMCA (de sus siglas en inglés, *Protein Misfolding Cyclic Amplification*), la cual se basa en el principio de polimerización dependiente de nucleación para la propagación de amiloides (102). A nivel conceptual, la PMCA se asemeja a la técnica de la PCR (del inglés *Polymerase Chain Reaction*), donde a partir de una hebra de DNA molde se pueden obtener millones de copias idénticas gracias a una reacción en cadena que ocurre cíclicamente. La PMCA es una técnica similar, cuyo objetivo es la amplificación de priones utilizando proteína en lugar de ácidos nucleicos como en el caso de la PCR. Esta técnica consta de una primera fase de incubación en la que una pequeña cantidad de PrP^{Sc} o semilla entra en contacto con un exceso de PrP^C encefálica, que hace las veces de sustrato y se malpliega dando lugar a nuevas moléculas de PrP^{Sc}, que van siendo reclutadas por las fibras de PrP^{Sc} hasta formar agregados. En la siguiente fase, se aplica un ciclo de sonicación mediante ultrasonidos que se cree que fragmenta las fibras amiloides de PrP^{Sc} formadas, posiblemente favoreciendo la aparición de nuevos centros de nucleación disponibles para la siguiente fase de incubación. La cantidad inicial de PrP^{Sc} se ve aumentada de forma exponencial a medida que se suceden los ciclos de incubación y sonicación, mimetizando *in vitro* con una cinética acelerada el proceso de malplegamiento y propagación que ocurre *in vivo* (371). De esta manera, cantidades de PrP^{Sc} que son indetectables por métodos bioquímicos clásicos como el *Western blot*, pueden ser amplificadas mediante esta técnica y ser fácilmente detectadas posteriormente. Esto ha hecho de la PMCA una herramienta extremadamente sensible que ha resultado en un avance muy relevante en el campo de los priones por sus potenciales usos (372). La PMCA es capaz de mimetizar las propiedades fundamentales de la propagación priónica que ocurren *in vivo*, reproduciendo las características determinantes de las distintas cepas de priones *in vitro*. Así, la nueva PrP^{Sc} generada mediante PMCA

INTRODUCCIÓN

conserva las propiedades bioquímicas y biológicas de la semilla de PrP^{Sc} inicial, destacando su infectividad *in vivo* (103). Esta capacidad de replicar las principales cepas priónicas en un sistema *in vitro* de forma rápida, ha sido ampliamente explotada para estudiar la barrera de transmisión existente entre los roedores más utilizados como modelos de investigación (345), pero también en especies de mayor impacto socioeconómico (373, 374) y para desentrañar los mecanismos que rigen la resistencia a infección por priones de ciertas especies (175, 353). Sin embargo, se ha observado que la PMCA es capaz de superar algunas barreras infranqueables experimentalmente *in vivo*, ni siquiera mediante el uso de ratones transgénicos que sobre expresan PrP (375). Por tanto, los resultados obtenidos con este sistema deben evaluarse cuidadosamente y complementarse con otro tipo de estudios para conseguir una mejor comprensión de las barreras de transmisión. Además, la PMCA ha sido utilizada para la generación de muestras para realizar estudios estructurales (214), evaluar la efectividad de ciertos compuestos con capacidad anti-priónica (376) o investigar el papel de los cofactores en la propagación priónica (377), entre otras aplicaciones. Sin embargo, el propósito inicial de la PMCA fue la de servir como técnica de diagnóstico de las EET debido a su alta sensibilidad, lo que hacía de ella una herramienta propicia para tratar de detectar PrP^{Sc} en todo tipo de fluidos corporales (378). El posterior desarrollo de la técnica de RT-QuIC relegó a la PMCA como método de diagnóstico, debido entre otros a su menor complejidad técnica. No obstante, la PMCA sigue manteniéndose como una de las principales herramientas de investigación en el campo de los priones actualmente.

La PMCA experimentó un importante cambio con su adaptación a proteína recombinante, pasando de utilizar PrP^C purificada de cultivos celulares o encéfalos, como sustrato de la reacción, a PrP recombinante (rec-PrP) purificada de *E. Coli*. Esta nueva variante de la PMCA (PMCA recombinante o rec-PMCA) contribuyó a reforzar la hipótesis “solo proteína”, consiguiéndose priones infecciosos utilizando sustratos basados exclusivamente en PrP recombinante, sin la necesidad de ningún componente de origen encefálico (379). A pesar de las características diferenciales entre la rec-PrP y la PrP^C de mamíferos, como la ausencia de glicosilaciones o la falta de anclaje GPI, se han conseguido priones sintéticos *bona fide* mediante el uso combinado de rec-PrP y PMCA. Sin embargo, estos priones pueden presentar propiedades biológicas heterogéneas, destacando una infectividad limitada en muchos casos, a pesar de utilizar procedimientos idénticos a otros que resultaron en priones recombinantes infecciosos (380). Esto ha conducido a la obtención, por parte de diferentes grupos de investigación, de distintos priones recombinantes con capacidad infecciosa, como los generados por Supattapone y colaboradores mediante PMCA en presencia de cofactores como el RNA (381) o la fosfatidiletanolamina (382), o los producidos

INTRODUCCIÓN

por Castilla y colaboradores utilizando cofactores variados como el dextrano (377). Así, la PMCA ha demostrado que, aun con cierta variabilidad, es posible generar priones artificiales *in vitro* que presenten infectividad similar a los priones de mamíferos, facilitando así el estudio de las EET.

3.3.- Amplificación de proteínas malplegadas por agitación: PMSA

Recientemente se ha desarrollado en nuestro laboratorio la técnica denominada amplificación de proteínas malplegadas por agitación (PMSA, del inglés *Protein Misfolding Shaking Amplification*) (383). Esta técnica trata de combinar los puntos fuertes de los sistemas de propagación *in vitro* anteriores tratando de solventar sus principales limitaciones. Algunos de los problemas que presenta la PMCA son la necesidad de costosos y complejos equipos de sonicación, su limitada escalabilidad y la necesidad de emplear técnicas de *immunoblot* para la visualización de resultados. La posibilidad de sustituir la sonicación por agitación como fuente de energía ya fue aprovechada por la RT-QuIC, aunque al no dar lugar a priones *bona fide*, su utilidad se limita a la detección y diagnóstico de EET. Por otra parte, la falta de conocimiento de los eventos moleculares que tienen lugar durante la PMCA y a la dificultad de controlar los parámetros de sonicación, conduce a la generación de PrP^{res} con distintas propiedades biológicas, originando mezclas heterogéneas que pueden dificultar los estudios bioquímicos y estructurales (206).

Sin embargo, la novedosa técnica de PMSA supera estos problemas de complejidad, variabilidad, escalabilidad y dificultad de implementación, basándose en el uso de agitación en lugar de sonicación como fuente de energía (384). La agitación se administra mediante el uso de sistemas *Thermomixer* o *Monoshake* de forma continua, a diferencia de los ciclos de sonicación/incubación que requiere la PMCA. Otra diferencia es la naturaleza del sustrato, compuesto únicamente por rec-PrP y dextrano sulfatado en un buffer de composición totalmente definida que contiene además detergentes y sales. El sistema requiere también del uso de partículas esféricas de zirconia – sílice de 1.0 mm para mejorar la eficiencia de la propagación, consiguiendo así que un prion recombinante *bona fide* de topillo rojo procedente de PMCA, se adapte a PMSA manteniendo sus características fundamentales. Por otro lado, la utilización de dextrano sulfatado como cofactor limita la generación de PrP^{res} estructuralmente heterogéneas, permitiendo por primera vez la generación de priones recombinantes altamente infecciosos y homogéneos respecto a los obtenidos mediante PMCA junto con homogenizados de encéfalo completos como fuente de cofactores. Este nuevo sistema podría ser, por tanto, clave para la obtención de material

INTRODUCCIÓN

con las características necesarias para estudios estructurales mediante técnicas de alta resolución, aunque ya ha demostrado su alto valor en otros campos de la investigación, permitiendo el testado masivo de bibliotecas de compuestos con posible actividad anti-priónica (385, 386) o la evaluación de diferentes métodos de descontaminación de priones de forma rápida y segura (387). Las posibilidades de esta técnica de reciente desarrollo podrían ser numerosas y requieren de una mayor exploración, lo que hace que sea el sistema más utilizado a lo largo de esta tesis doctoral, donde explotaremos sus características para generar distintos priones recombinantes *bona fide*, comprender mejor el fenómeno de cepa y aportar información acerca del evento de malplegamiento espontáneo que tiene lugar en las EET.

4.- Enfermedad debilitante crónica

Inicialmente descrita en Estados Unidos, fundamentalmente en Colorado y Wyoming, la enfermedad debilitante crónica de cérvidos (EDC) se localiza en Estados Unidos, Canadá, Corea del Sur y, desde que recientemente se descubriera el primer caso en Noruega, en Europa (388, 389). Su rápida diseminación y alta prevalencia en animales cazados y consumidos habitualmente en ciertos países, han llevado a una creciente preocupación por una posible zoonosis como la ocurrida en Reino Unido con la EEB. Por tanto, el estudio de la transmisibilidad de la EDC a humanos resulta de gran interés para la salud pública, aunque todas las evidencias reunidas hasta el momento indican que podría no ser transmisible (388).

Esta enfermedad, que afecta a ungulados, se diferencia del *scrapie* y de la EEB por su aparición en la población de animales salvajes, además de en los domésticos (390, 391). Además, un componente clave en la patogénesis de esta enfermedad que requiere más investigación es la aparición de proteína priónica malplegada en tejidos periféricos como mucosas y glándulas salivares entre otros, facilitando su transmisibilidad. Sin embargo, tiene muchas características en común con el *scrapie*, incluyendo la distribución de la PrP^{Sc} en el tejido linfoide, que precede la invasión del sistema nervioso central (SNC) (388). Los signos clínicos y las lesiones de EDC son similares a las de otras EETs, caracterizadas por espongirosis y lesiones en el cerebro y en la médula espinal y por largos periodos de incubación (392).

El origen de la EDC sigue siendo desconocido, aunque se han propuesto varias hipótesis. Una de ellas sugiere que la EDC surgió como una enfermedad priónica esporádica y la transmisión horizontal [de manera directa a través del tejido de un animal infectado o de manera indirecta a través de la orina, heces y saliva que contaminan la tierra donde habitan dichos animales (393)] fue decisiva en el mantenimiento de la epidemia de EDC (394). El prión responsable de la EDC también se ha podido transmitir de forma experimental a una gran variedad de especies de animales salvajes y de laboratorio, entre ellos a bovinos

INTRODUCCIÓN

y ovinos, observándose una gran eficacia en su transmisibilidad (395, 396). Sin poder descartar un origen genético de la enfermedad en la población de cérvidos, es probable que el origen del *scrapie* en óvidos tenga un nexo en común con el origen de la EDC en cérvidos, teniendo en cuenta la gran eficacia de infección de *scrapie* en ciervo mostrando lesiones neuropatológicas indistinguibles de la EDC (397).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Los priones recombinantes *bona fide* basados en la PrP de cérvido y obtenidos mediante la técnica de PMSA son un modelo útil para el estudio del efecto de diferentes polimorfismos en el malplegamiento espontáneo y en la emergencia y evolución de cepas priónicas.

Objetivos

1. Detectar y recoger todas las variantes polimórficas de PrP de cérvido descritas en la naturaleza y otras variantes de interés basadas en las anteriores para su producción en bacterias.
2. Determinar la metodología más eficiente para la obtención sistemática de PrP recombinantes de cérvidos malplegadas espontáneamente por PMSA, utilizando las PrP recombinantes de corzo y uapití como modelo de estudio.
3. Generar un panel de pruebas *in vitro* que permitan clasificar las diferentes PrP recombinantes de cérvidos malplegadas por PMSA de acuerdo con sus características bioquímicas, utilizando las PrP de corzo y uapití como modelo de estudio.
4. Analizar el efecto de la ausencia o presencia de cofactor en la generación de potenciales cepas priónicas por malplegamiento espontáneo *in vitro* y en la evolución de estas, utilizando las PrP de corzo y uapití como modelo de estudio.
5. Confirmar la generación de priones recombinantes *bona fide* mediante la caracterización biológica de las PrP recombinantes de corzo y uapití malplegadas espontáneamente en ausencia y presencia de cofactor.
6. Evaluar el impacto de cada polimorfismo de las PrP de cérvidos en su capacidad de malplegamiento espontáneo por PMSA y en la generación de potenciales cepas priónicas.
7. Determinar el rol del residuo 226 de la PrP de cérvidos en la evolución de potenciales cepas.
 - a. Estudiar el comportamiento de las potenciales cepas de corzo y uapití obtenidas por malplegamiento espontáneo por PMSA tras su propagación en rec-PrP de cérvidos con los aminoácidos glutamina o glutamato en el residuo 226.
 - b. Analizar las propiedades bioquímicas de las potenciales cepas obtenidas por malplegamiento espontáneo *in vitro* de las variantes polimórficas de la PrP de cérvidos tras su propagación en PrP recombinante de corzo.
 - c. Evaluar el efecto del extremo C-terminal de la PrP recombinante de cérvidos en el malplegamiento espontáneo *in vitro* y en la evolución de las características bioquímicas

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

de las potenciales cepas recombinantes de corzo y uapití, utilizando una PrP recombinante de cérvido con una delección a partir del residuo 226.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Construcción de los plásmidos de expresión de las PrP de corzo y uapití, las PrP de cérvidos con los polimorfismos descritos en la naturaleza, la PrP de cérvido con delección en el extremo C-terminal y PrP de otras especies utilizadas en su caracterización

Las distintas PrP recombinantes utilizadas en este trabajo y producidas en *Escherichia coli* (*E. coli*) se obtienen a partir de vectores plasmídicos especializados en la expresión de genes eucariotas. En concreto, utilizamos los vectores pOPIN desarrollados por *Oxford Protein Production Facility UK* (OPPF). Estos vectores están especialmente diseñados para su clonación mediante el sistema *In Fusion*, que permite una alta expresión de la proteína clonada (398). Concretamente, utilizamos el plásmido pOPIN E, basado en el vector pTriEx2 cuyas principales características son su resistencia al antibiótico ampicilina, la presencia de un *enhancer* (del inglés, potenciador) híbrido de Citomegalovirus (CMV), del promotor de β -actina que permite la expresión de proteínas eucariotas en bacterias *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*).

1.1. Generación de plásmidos con PrP de distintas especies mediante recombinación homóloga

Para la producción de las PrP recombinantes de corzo (*Capreolus capreolus*), mapache (*Procyon lotor*), vaca (*Bos taurus*), mono ardilla (*Saimiri sciureus*), oveja (*Ovis aries*) (con polimorfismos A136, R154 y Q171, ARQ, V136, R154 y Q171, VRQ, y A136, R154 y R171, ARR), hámster sirio (*Mesocricetus auratus*), visón (*Neovison vison*), gato (*Felis silvestris catus*) y cerdo (*Sus scrofa*) en *Escherichia coli* (*E. coli*), primero se obtuvieron sus respectivos ADN genómicos a partir de distintos tejidos o fluidos biológicos, de los cuales se extrajo la secuencia del gen codificante o el ORF (marco abierto de lectura, del inglés, *Open Reading Frame*) de la PrP mediante PCR, para su clonación en el vector pOPIN E mediante recombinación homóloga.

Para ello, el vector pOPIN E se sometió a una digestión con las enzimas de restricción NcoI y PmeI (New England Laboratories) siguiendo el protocolo de la OPFF (*A Guide to using the OPFF 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 pb (pares de bases) se purificó mediante el kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la clonación de las diferentes secuencias de PrP en el vector pOPIN E mediante el sistema de recombinación homóloga *In Fusion*, los extremos de las secuencias de los ORF de cada uno de los genes de las PrP de interés, extraídas previamente de tejidos de cada especie utilizando el kit de extracción de ADN genómico *NucleoSpin Tissue* (Macherey-Nagel), se amplificaron y adecuaron a la recombinación homóloga mediante la técnica de 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 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 inmediatamente anterior de la cola de histidinas con el fin de evitar el corte con carboxi-peptidasa 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 octa-repeticiones 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. Los tejidos de los que se obtuvo el ADN en cada caso y las secuencias 5'-3' de los oligonucleótidos *forward* (del inglés, hacia adelante) (F) y *reverse* (del inglés, reverso) (R), utilizados en las PCR son las siguientes:

Especie	Tejido	Número acceso Genebank	Oligonucleótido <i>forward</i> (F)	Oligonucleótido <i>reverse</i> (R)
Corzo	Encéfalo de ratón Tg1536 (ref.)	MN390587.1	AGGAGATATACCATGA AGAAGCGACCAAACC TGG	GTGATGGTGATGTTAAC TTGCCCTCTTTGGTAAT A
Mapache	Encéfalo de tejón europeo (<i>Meles meles</i>)	EU341505.1	AGGAGATATACCATGA AGAAGCGGCAAACC TGG	GTGATGGTGATGTTAAC TCGCCCCCTCTGGTAGT A

MATERIALES Y MÉTODOS

Vaca	Encéfalo de vaca	AB534907.1	AGGAGATATACCATGA AGAAGCGACCAAACC TGG	GTGATGGTGATGTTAAC TTGCCCTCGTTGGTAAT A
Mono ardilla	Hígado de mono ardilla	U08310.1	AGGAGATATACCATGA AGAAGCGCCCGAAACC TGG	GTGATGGTGATGTTAGC TCGATCCTCTCTGGTAAT A
Oveja ARQ	Encéfalo oveja Cheviot	AB621927.1	AGGAGATATACCATGA AGAAGCGACCAAACC TGG	GTGATGGTGATGTTAAC TTGCCCCCTTTGGTAAT A
Oveja VRQ	Encéfalo oveja	AJ567988.1	CCGGAATTCCGGCGTA CGATGGTGAAAAGCCA CATAGGC	CTAGTCTAGACTAGGCC GGCCCTATCCTACTATG AGAAAAATG
Oveja ARR	Encéfalo de oveja	AB621928.1	CCGGCGGCCGCGTACG ATGGTGAAAAGCCACA TAGGC	CTAGGAATTCTAGGCCG GCCCTATCCTACTATGA GAAAAATG
Hámster sirio	Encéfalo de hámster sirio	AH001830.2	AGGAGATATACCATGA AGAAGCGCCCAAAGC CTGG	GTGATGGTGATGTTTGG ACCTTCTTCCATCGTAGT A
Visón	Encéfalo de visón	EF508270.1	AGGAGATATACCATGA AGAAGTGCCCAAAGC CTGG	GTGATGGTGATGTTAGC TCGCCCCCTTCTGGTAGT A
Gato	Encéfalo de gato	EU341499.1	AGGAGATATACCATGA AGAAGCGCCGAAGC CTGG	GTGATGGTGATGTTAGC TCGCCCCCTTTGGTAGT A
Cerdo	Hígado de cerdo	XM_013985025.2	AGGAGATATACCATGA AGAAGCGACCAAAGCC TGG	GTGATGGTGATGTTAAC TGGCCCCCTTTGGGCG TA

Utilizando como molde el DNA genómico de las especies indicadas anteriormente, se realizó una PCR con el fin de amplificar la secuencia de interés mediante los oligonucleótidos específicamente

MATERIALES Y MÉTODOS

diseñados y mostrados en la tabla 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 DNA 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, finalizando 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 de cada 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 DNA metilados procedentes del molde utilizado para la reacción. Las muestras digeridas se purificaron mediante el kit *QIAquick PCR purification kit* (Qiagen) siguiendo las especificaciones del fabricante.

Una vez obtenidos el vector y los fragmentos para clonar linealizados, se procedió a la realización de 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 e inserto utilizando un equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) con el objetivo de mezclar de ambos componentes en proporción molar 1:2 (vector:fragmento). Finalmente, los productos resultantes de la recombinación 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* (399). 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 de interés se realizó un análisis de restricción de los plásmidos con las enzimas de restricción XbaI y BspHI (Fermentas,

MATERIALES Y MÉTODOS

Thermofisher Scientific). 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 del plásmido con PrP de uapití mediante mutagénesis dirigida

Para la obtención de la PrP recombinante de uapití (ON167508.1), al contener un solo cambio respecto a la PrP recombinante de corzo, se decidió utilizar una estrategia de mutagénesis dirigida en dos pasos. El diseño de los oligonucleótidos para ello, lo determinó el tipo de secuencia a los lados de 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 diseñaron las secuencias del oligonucleótido *forward* (del inglés, hacia adelante) (F) y la secuencia del oligonucleótido *reverse* (del inglés, reverso) (R), obtenida a partir de la secuencia reversa y complementaria del oligonucleótido *forward*. La selección de los mejores oligonucleótidos posibles se refinó mediante el software libre "Oligo analyzer 3.1" (Integrated DNA Technologies), obteniéndose los dos oligonucleótidos siguientes:

Oligonucleótido forward: 5'- CCAGAGAGAATCC**GAG**GCTTATTACCAAAG -3'

Oligonucleótido reverse: 5'- CTTTGGTAATAAG**CCTCG**GATTCTCTCTGG -3'

Además de los oligonucleótidos específicos diseñados para introducir el cambio Q226E, se diseñaron dos oligonucleótidos que hibridan con una secuencia del vector pOPIN E que contiene la PrP de corzo, un oligonucleótido *forward* cerca del extremo 3' y un oligonucleótido *reverse* cerca del extremo 5' del ORF de la PrP:

Oligonucleótido forward: 5'- CCGCGGGGGGACGGCTGCC -3'

Oligonucleótido reverse: 5'- GAACAGAGGTGCGTCTGGTG -3'

Así, se realizaron primero dos PCR, una de ellas con el oligonucleótido *forward* que contenía la mutación y el oligonucleótido *reverse* del extremo 5'; y la otra con el oligonucleótido *forward* del extremo 3' y el oligonucleótido *reverse* que contenía la mutación. En todos los casos y en esta primera fase, las PCR realizadas contenían: 2 ng de plásmido pOPIN E con la PrP de corzo, 50 ng de cada oligonucleótido, 1.25 unidades de la enzima *Pfu DNA Polymerase* (Fermentas, Thermofisher Scientific), 5 µl del *buffer* (del inglés, tampón) 10x para la enzima Pfu (20 mM MgSO₄), 0.4 µl de dNTP 10 mM y H₂O hasta completar un volumen final de 50 µl. Las condiciones de PCR aplicadas fueron en primer lugar, un ciclo inicial de desnaturalización

MATERIALES Y MÉTODOS

del molde de ADN de partida mediante calentamiento a 95 °C durante 5 min, a continuación, 40 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 de 95 °C durante 20 s, seguido de un periodo de 45 s a 56 °C que facilita la hibridación de los oligonucleótidos con el molde de DNA y finaliza con un periodo de 60 s a 72 °C que permite la polimerización de las nuevas cadenas de DNA. Los productos de PCR fueron almacenados y conservados a 4 °C.

Como resultado de esta primera fase se obtuvieron dos fragmentos de ADN que contenían cada uno de ellos un fragmento del gen que codifica la PrP de uapití. Con el objetivo de retirar los *buffers* presentes de la reacción anterior, se realizó una purificación de todos los fragmentos mediante el uso del kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) y siguiendo el protocolo del fabricante (*QIAquick® Spin Handbook*). El segundo paso de la mutagénesis dirigida consistió en la reconstitución completa de los genes que codifican la PrP de uapití. Para ello se realizó de nuevo una PCR empleando como moldes los dos fragmentos obtenidos en el paso anterior y los oligonucleótidos *forward* y *reverse* que hibridan respectivamente en la región cercana al extremo N-terminal y C-terminal del gen que codifica la PrP. En todos los casos y en esta última fase, las PCR empleadas contenían: 50-100 ng de fragmentos de ADN purificados de la primera fase, 50 ng de los oligonucleótidos *forward* y *reverse*, 1.25 unidades de la enzima *Pfu DNA Polymerase* (Fermentas, Thermofisher Scientific), 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, Thermofisher Scientific) siguiendo el protocolo del fabricante.

Con el fin de clonar el fragmento de ADN obtenido en el apartado anterior en el vector de expresión pOPIN E, se llevaron a cabo las siguientes digestiones con enzimas de restricción y purificaciones. En primer lugar, el fragmento de ADN que codifica la PrP de uapití se digirió con la enzima de restricción XbaI (Fermentas, Thermofisher Scientific) y posteriormente, tras realizar una purificación con *GeneJet PCR Purification Kit* (Fermentas, Thermofisher Scientific), se digirió con la enzima de restricción BspHI (Fermentas, Thermofisher Scientific), en todos los casos, siguiendo las especificaciones del fabricante. La enzima de restricción XbaI reconoce una secuencia de DNA ubicada cerca del extremo N-terminal de la secuencia del gen que codifica la PrP, mientras que BspHI digiere en una zona cercana al extremo C-terminal, dando lugar a fragmentos de aproximadamente 1050 pb. Para la elección de las enzimas de restricción mencionadas se utilizó el software libre “NEBcutter V2.0” (New England Biolabs). Los

MATERIALES Y MÉTODOS

fragmentos digeridos se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v), tinción con *RedSafe* 0.1 % (v/v) (Proquinorte) y *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen). El plásmido pOPIN E con la PrP de corzo se digirió también con las enzimas de restricción XbaI y BspHI, siguiendo el procedimiento mencionado anteriormente. Los fragmentos de 4707 pb se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, de nuevo con tinción con *RedSafe* 0.1 % (v/v) (Proquinorte) y *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen). Finalmente, el plásmido y el inserto se mezclaron a una ratio molar de 3:1 (inserto:vector) y se ligaron con la enzima *T4 DNA ligasa* (Fermentas, Thermofisher Scientific) incubando la mezcla de reacción a 16 °C, como indica el protocolo del fabricante. Los productos de la ligación se transformaron en bacterias ultra-competentes *E. coli DH5 XL-GoldR* (Stratagene) siguiendo el protocolo estándar de transformación por choque térmico. Se seleccionaron 4-6 colonias bacterianas y los plásmidos procedentes de estas colonias bacterianas se purificaron mediante *GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas, Thermofisher Scientific). Para verificar que los plásmidos purificados tenían incorporado la ORF del gen que codifica la PrP de uapití, se realizó un análisis de restricción con las enzimas XbaI y BspHI. Finalmente, con el fin de asegurar que los plásmidos obtenidos contenían la mutación deseada, la ORF del gen que codifica la PrP se secuenció completamente mediante el servicio de secuenciación de *Stabvida* con el oligonucleótido universal T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3').

1.3. Generación del resto de plásmidos mediante síntesis génica y subclonaje en pOPINE

Para el resto de PrP recombinantes utilizadas en este trabajo, como la de hurón (*Mustela putorius*, XM_013046067.2), ratón de patas blancas (*Peromyscus leucopus*, XM_028878611.2), ratón ciervo (*Peromyscus maniculatus*, EF467170.1), topillo de la pradera (*Microtus ochrogaster*, XM_005365568.2), topillo de lomo rojo (*Myodes gapperi*, GQ850538.1), castor (*Castor canadensis*, XM_020184027.1), todas las variantes polimórficas descritas para PrP de cérvidos (detalles de secuencia en la tabla XX de Resultados) y la PrP de cérvido con delección C-terminal (CerviDel, PrP de corzo aminoácidos 23 a 225), se optó por la síntesis génica y el posterior subclonaje de la secuencia de interés en el vector pOPINE, realizados por NZYtech (Portugal) o GenScript (Países Bajos), dado el gran número de construcciones. Como comprobación adicional de que los plásmidos recibidos de ambas compañías contenían las PrP recombinantes correctas, la ORF del gen que codifica la PrP se secuenció completamente mediante el servicio de secuenciación de *Stabvida* con el oligonucleótido universal T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3').

2. Obtención de proteínas del prion recombinantes

MATERIALES Y MÉTODOS

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

Para producir las PrP recombinantes a partir de los plásmidos pOPINE generados anteriormente, todos ellos se transformaron en bacterias competentes *E. coli* Rosetta (DE3)TM (EMD Millipore), desarrolladas especialmente para la expresión de proteínas eucariotas. Los plásmidos pOPINE se transformaron específicamente en estas bacterias mediante el protocolo estándar de transformación por choque térmico (399). Posteriormente se conservaron a -80 °C en medio LB + glicerol en proporción 1:1 (v:v).

2.2. Expresión y purificación de las PrP recombinantes para su posterior uso en sistemas de propagación *in vitro*

Las bacterias DE3 transformadas con cada plásmido se cultivaron en 50 ml de medio LB en presencia de ampicilina (20 µg/ml) a 37 °C en agitación a 200 rpm durante toda la noche. A continuación, estos 50 ml se mezclaron con 1 L de medio LB con ampicilina (20 µg/ml) y se incubaron a 37 °C en agitación a 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica en la longitud de onda de 600 nm (DO₆₀₀) de 0.8 – 1.0. Una vez alcanzada, se añadió al cultivo bacteriano isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Gold Biotechnology) a una concentración final de 1 mM con el objetivo de inducir la síntesis de proteínas en las bacterias DE3. Una vez añadido el IPTG se mantuvieron las condiciones de temperatura y agitación descritas durante 3 h. Pasadas las 3 horas, la inducción se detuvo con la incubación de los cultivos bacterianos en hielo durante 15 min. Finalmente, los cultivos se centrifugaron durante 15 min a 4500 g y a una temperatura de 4 °C (Centrífuga Sorvall Legend XTR, Thermo Scientific) con el objetivo de precipitar las bacterias que acumulan la proteína recombinante producida en forma de cuerpos de inclusión.

El precipitado bacteriano resultante se resuspendió en 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 µg/ml Lisozima (Sigma-Aldrich), ajustado a pH 8.0] y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente en presencia de 100 U/ml de desoxirribonucleasa (DNAsa) (Sigma-Aldrich) con agitación suave y MgCl₂ (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 20 mM. El producto lisado se centrifugó a 8500 g (Centrífuga Sorvall ST 16R, Thermo Scientific) durante 1 h y a una temperatura de 4 °C. El precipitado resultante 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]. El material resuspendido se centrifugó de nuevo

MATERIALES Y MÉTODOS

a 8500 g durante 1 h a 4 °C y el precipitado resultante se disgregó 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]. Con el objetivo de disolver totalmente los cuerpos de inclusión presentes en el precipitado, el material resuspendido se incubó a 37 °C durante toda la noche con agitación suave. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 8500 g durante 1 h a 4 °C. El sobrenadante resultante se filtra utilizando filtros de jeringa con un tamaño de poro de 0.22 µm (Minisart, Sartorius Stedim).

Una vez filtrada, la PrP recombinante presente en la muestra se purificó utilizando columnas de afinidad de histidinas *HisTrap FF Crude 5 ml* (GE Healthcare Amersham) acopladas a un sistema de FPLC (ÄKTA™ start, GE Healthcare Amersham). Las columnas se equilibraron con 35 ml de solución de unión [20 mM Tris-HCl (Fisher Bioreagents), 500 mM NaCl (Sigma-Aldrich), 5 mM Imidazol (Sigma-Aldrich), 2 M GndCl (Fisher Scientific), ajustado a pH 8.0]. Seguidamente, la muestra se cargó en la columna, se lavó con 75 ml de solución de unión y finalmente la PrP se eluyó utilizando 30 ml de solución de elución [20 mM Tris-HCl (Fisher Bioreagents), 500 mM NaCl (Sigma-Aldrich), 500 mM Imidazol (Sigma-Aldrich), 2 M GndCl (Fisher Scientific), ajustado a pH 8.0]. Las proteínas purificadas se desnaturalizaron completamente aumentando la concentración de Gdn-HCl hasta 6 M y posteriormente 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.

La pureza de las proteínas recombinantes obtenidas y la eficacia del proceso de purificación se evaluaron mediante tinción de proteína total tras electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) en geles *Criterion TGX 4 – 15 %* (Bio-Rad). A lo largo del proceso de purificación se fueron recogiendo fracciones de 10 µl de varios de los eluidos obtenidos. En concreto se recogieron muestras de 10 µl de la muestra filtrada antes de cargarla en la columna de afinidad, de la muestra filtrada tras su paso por la columna y de la proteína final purificada. A continuación, las muestras de 10 µl se precipitaron añadiendo 56.7 µl de metanol frío (Fisher Chemical) y tras centrifugar durante 30 min a una velocidad de 19 000 g y a 4 °C (Centrífuga Sorvall ST 16R, Thermo Scientific), el material precipitado 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 cargó en el gel de

MATERIALES Y MÉTODOS

electroforesis. Por último, el gel se incubó durante 1 h a temperatura ambiente en solución de tinción *BlueSafe* (NZYTech).

3. PMSA para la generación y propagación de priones *in vitro*

Esta técnica ha sido la principal herramienta utilizada a lo largo de esta tesis doctoral, aplicada en diversas condiciones. En este apartado se detallarán las distintas condiciones de preparación de sustratos con las proteínas priónicas recombinantes descritas en el primer apartado.

3.1. Preparación de sustratos para PMSA

A lo largo del proceso de preparación, todos los componentes que forman parte de los sustratos se mantuvieron a 4 °C para preservar su estabilidad. Tras su preparación, se alicuotaron convenientemente y se conservaron de diferente manera según el uso al que fueran destinados; a 4 °C durante un máximo de 24 h protegidos de la luz si el sustrato iba a utilizarse para la generación espontánea de rec-PrP^{res} o a -80 °C, hasta la realización del experimento de propagación o estabilización en el resto de los casos.

Para preparar sustrato basado en PrP recombinantes salvo en casos excepcionales que se detallan más adelante, las proteínas purificadas mediante columnas de afinidad HisTrap se diluyeron a una ratio 1:5 en PBS (Fisher BioReagents), fueron inyectadas en casetes de diálisis con un límite de exclusión de 10 kDa *Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette 10K MWCO* (Thermo Scientific) y se dializaron durante 1 h frente a PBS a temperatura ambiente con el objetivo de retirar el GndCl presente en la proteína recombinante y permitir su plegamiento. Durante el proceso de diálisis se forman agregados de proteína anormalmente plegada. Para la eliminación de estos precipitados, las muestras dializadas se centrifugaron a 19 000 *g* durante 15 min a 4 °C (Centrífuga Sorvall ST 16R, Thermo Scientific). Pasado ese tiempo, se recogió el sobrenadante con la PrP soluble plegada y se sometió a un ensayo para determinar su concentración, utilizando el kit *BCA Protein Assay* (Fisher Scientific) siguiendo el protocolo del fabricante para monitorizar cualquier problema durante la diálisis. Tras ello, se realizó una medida adicional en un dispositivo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), utilizando para ello 1 µl de la preparación, con el objetivo de confirmar el resultado del ensayo previo. Estas mediciones de concentración de la proteína dializada sirvieron para ajustar la concentración de todas las proteínas a aproximadamente 0.8 mg/ml. Una vez preparada la proteína, esta se diluyó en solución de conversión fría [PBS (Fisher BioReagents), 150 mM NaCl (Sigma-Aldrich), 1 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich)] a una ratio 1:10. De esta forma la concentración final de PrP recombinante en el sustrato era de 80 µg/ml (3.5 µM). Por último, se añadió dextrano sulfatado (MW 6500-10 000, Sigma-Aldrich) hasta alcanzar una concentración final de 0.5 % (p/v), o en

MATERIALES Y MÉTODOS

aquellos sustratos sin cofactor (llamados CB a lo largo de la tesis), se añadió el volumen equivalente del *buffer* de conversión.

3.2. Estudio de la adsorción de PrP recombinante a partículas esféricas de vidrio

Dada la variabilidad observada previamente en el laboratorio respecto a la capacidad de las partículas esféricas de vidrio de adsorber PrP en su superficie en función de la secuencia aminoacídica, se estudió la cinética de la adsorción de las PrP recombinantes de corzo y uapití de un sustrato de PMSA en presencia de distintas cantidades de partículas esféricas de vidrio de 0.1 y 1 mm de diámetro (BioSpec Products). De esta forma se pretendía determinar la causa por la que, a una misma superficie de vidrio, el malplegamiento espontáneo por PMSA resultaba menos eficiente con las partículas de 0.1 mm. Para ello, se incubaron durante 24 h a temperatura ambiente y con agitación orbital continua, los sustratos de PMSA con rec-PrP de corzo y uapití con dextrano sulfatado, en presencia de 50π y 500π mm² de cada tipo de partículas de vidrio, extrayendo muestra del sobrenadante a 1 h, 4 h y 24 h. Utilizando 400 μ l de cada muestra, se realizaron diluciones 1:1, 1:4 y 1:8 en PBS (Fisher BioReagents), determinando la cantidad de rec-PrP en solución en cada punto temporal mediante electroforesis y tinción de proteína total, como se detalla más abajo. La concentración relativa de rec-PrP soluble respecto a la del sustrato inicial, se determinó mediante análisis densitométrico, utilizando para ello el software ImageJ (NIH).

3.3. PMSA para la generación espontánea de priones recombinantes *in vitro*

Los diferentes sustratos de PMSA basados en las PrP recombinantes de cérvidos u otras especies, fueron divididos en alícuotas de entre 500 y 800 μ l en tubos tipo eppendorf de 2 ml con fondo cónico (Thermo Scientific) y tapón de rosca, previamente rellenos con entre 0 y 1 g de partículas esféricas de vidrio de 0.1 o 1 mm de diámetro (BioSpec Products). Tras las pruebas iniciales para determinar una metodología eficiente para el malplegamiento espontáneo, se decidió utilizar 0.1 g de las esferas de vidrio de 1 mm de diámetro en los tubos de PMSA. Los tubos con sustrato se sometieron a PMSA durante 24 h a 39 °C de temperatura y agitación continua a 700 rpm utilizando termobloques (*Digital Shaking Drybath*, Thermo Scientific) que permitían un control preciso de estos parámetros. Para pesar la cantidad necesaria de partículas esféricas se utilizó una balanza de precisión Summit SI234.3 (Denver Instrument). En los casos en los que se requería más de una ronda de 24 h de PMSA para la obtención de PrP recombinante malplegada y resistente a proteasa (rec-PrP^{res}), se realizaron rondas seriadas de 24 h de PMSA en las mismas condiciones, realizando una dilución 1:10 del producto de la ronda anterior de PMSA como semilla en un tubo con sustrato fresco y esferas de vidrio de 1 mm. Excepcionalmente, para evaluar la posibilidad de realizar rondas seriadas de PMSA para el malplegamiento espontáneo utilizando las esferas de vidrio

MATERIALES Y MÉTODOS

de la ronda anterior en lugar del producto líquido diluido 1:10, se realizaron rondas seriadas eliminando el producto de la ronda anterior y añadiendo sustrato fresco sobre las esferas de vidrio ya utilizadas.

3.4. Adsorción de rec-PrP^{res} a partículas esféricas de zirconia – sílice

Dado que es posible adsorber ciertas semillas recombinantes a partículas esféricas de diferente material y utilizarlas en PMSA directamente como semillas sin la necesidad de realizar diluciones (387), decidimos aplicar este método con las rec-PrP^{res} de cérvido obtenidas espontáneamente a lo largo de este estudio, dado que facilita la conservación de las semillas y ayuda a uniformizar títulos frente a las semillas en suspensión, además de evitar la inclusión en las propagaciones subsiguientes posibles rec-PrP^{res} minoritarias que pudiesen haberse generado durante las PMSA con partículas esféricas de vidrio. Para ello, se llevó a cabo una propagación mediante PMSA de las rec-PrP^{res} presentes en el producto líquido resultante de una determinada ronda de PMSA, en presencia de partículas esféricas de zirconia – sílice de 1.0 mm de diámetro. Antes de la propagación, las partículas esféricas se lavaron tres veces con PBS (Fisher reagents) y una última vez con H₂O estéril libre de nucleasas (Amresco, VWR International Eurolab) mediante agitación en vórtex. En tubos de tipo eppendorf de 2.0 ml con fondo cónico (Thermo Scientific) se añadieron 250 mg de partículas esféricas lavadas y se agregaron 800 µl del sustrato homólogo a la rec-PrP^{res} que se quería estabilizar en cada caso. Seguidamente, se añadió la semilla, el producto de PMSA cuya rec-PrP^{res} quería estabilizarse para su posterior uso en propagación o para su análisis bioquímico, en proporción 1:100 (semilla:sustrato). Estos tubos con sustrato y semilla se sometieron a una ronda seriada de PMSA de 24 h, a 700 rpm y 39 °C utilizando un termobloque con agitación (*Digital Shaking Drybath*, Thermo Scientific). Tras esta primera ronda de PMSA, se realizaron dos rondas seriadas más en las mismas condiciones, utilizando una dilución 1:10 del producto de la ronda anterior y sustrato fresco con la misma cantidad de esferas de zirconia – sílice lavadas. Al producto de la tercera ronda seriada de PMSA, se le añadieron otros aproximadamente 250 mg de esferas de zirconia – sílice lavadas que se incubaron a temperatura ambiente y con agitación durante 1h. Finalmente, tanto las esferas utilizadas en la tercera ronda de PMSA como el producto líquido, se utilizaron en una cuarta ronda seriada de PMSA, utilizando en este caso una dilución 1:4 de semilla respecto al sustrato, saturando la reacción de rec-PrP^{res}. Tras esta cuarta ronda de PMSA, el producto líquido se analizó para confirmar la presencia de rec-PrP^{res} mediante digestión con PK y tinción de proteína total, y se conservó a -20 °C para ser utilizado como semilla en formato líquido en posteriores experimentos. En el caso de las partículas esféricas de zirconia – sílice, se lavaron con PBS tres veces, y se dejaron secar en una estufa a 37 °C conservándolas después a

MATERIALES Y MÉTODOS

temperatura ambiente hasta su uso como semillas en posteriores experimentos de propagación mediante PMSA.

Previo al uso de éstas partículas como semilla en PMSA, se llevó a cabo una ronda de propagación adicional como control de calidad confirmando su capacidad de inducir malplegamiento mediante PMSA en sustrato homólogo. Para ello, se utilizaron 4 réplicas por lote de partículas esféricas con rec-PrP^{res} adsorbida, en las que se añadía una partícula de zirconio – sílice de 2.3 mm de diámetro (BioSpec Products) para favorecer la propgación y una única esfera de 1 mm con rec-PrP^{res} adsorbida. Tras una ronda de PMSA de 24 h a 39 °C y 700 rpm de agitación constante en un termobloque con agitación (*Digital Shaking Drybath*, Thermo Scientific), el producto se analizó mediante digestión con proteinasa, electroforesis y tinción de proteína total tal y como se detalla en una sección posterior. Únicamente aquellos lotes de esferas de zirconio – sílice de 1 mm de diámetro con rec-PrP^{res} adsorbida que dieron lugar a nueva rec-PrP^{res} en las cuatro réplicas se consideraron aptas para su conservación y posterior uso como semilla de propagación en PMSA.

3.5. PMSA para la propagación de priones recombinantes *in vitro*

Una vez generadas rec-PrP^{res} espontáneamente y tras la propagación y estabilización de las mismas en esferas de zirconia – sílice de 1 mm de diámetro, los estudios de transmisión *in vitro* a sustratos no homólogos, bien en términos de secuencia de PrP recombinante o bien en términos de cofactor (con o sin dextrano sulfatado) se realizaron mediante propagación seriada por PMSA, utilizando las esferas de zirconia – sílice con rec-PrP^{res} adsorbida como semilla. Estas rondas seriadas de PMSA se llevaron a cabo en tubos de tipo eppendorf de 2 ml con fondo cónico (Thermo Scientific) donde previamente se habían colocado entre 1 y 3 partículas esféricas de zirconia – sílice de 1 mm con semillas adsorbidas junto con entre 3 y 5 partículas esféricas de zirconia – sílice de 2.3 mm de diámetro previamente lavadas para promover la propagación (Eraña 2019 PLOS Pathogens), a los se añadían entre 500 y 800 µl del sustrato de PMSA deseado. Éstas rondas de PMSA se realizaron en un termobloque con agitación (*Digital Shaking Drybath*, Thermo Scientific) fijando una velocidad de agitación constante de 700 rpm e incubando las muestras a 39 °C entre 6 y 24 h acorde a las necesidades del estudio, indicándose el tiempo utilizado en cada apartado de Resultados correspondiente. En estos estudios se incluyeron también controles sin semilla para los que se utilizaron un número equivalente de partículas esféricas de zirconia – sílice de 1.0 mm y 3.2 mm lavadas, sin rec-PrP^{res} en su superficie, como controles de contaminación cruzada o de eventos de malplegamiento espontáneo. Con el fin de eliminar lo más rápidamente posible la semilla original y obtener así únicamente la adaptada al nuevo sustrato de propagación, se utilizaron al menos 3

MATERIALES Y MÉTODOS

de las partículas esféricas de 2.3 mm de diámetro provenientes de la primera ronda como semilla para una segunda ronda de PMSA seriada en las mismas condiciones, a las que se añadieron también 250 mg de partículas esféricas lavadas de zirconia – sílice de 1 mm de diámetro y entre 500 y 800 μ l del sustrato de PMSA deseado en caso de no detectarse rec-PrP^{res} en el producto de la primera ronda. En cambio, en aquellos estudios de transmisión en los que se detectó rec-PrP^{res} desde la primera ronda, la segunda ronda se realizó con 500 mg partículas lavadas de zirconia – sílice de 1 mm de diámetro junto con las 3 partículas de 2.3 mm, iniciando así la obtención de partículas de 1 mm con rec-PrP^{res} adsorbida. Así se realizaron hasta cuatro rondas seriadas en los casos en los que no se detectaba rec-PrP^{res}, aumentando la cantidad de partículas de zirconia – sílice de 1mm en la ronda posterior a la que se detectaba rec-PrP^{res} en cada caso. A partir de la ronda con un mayor número de partículas, se procedió a la obtención de un gran número de partículas con rec-PrP^{res} adsorbida para usar en posteriores estudios tal y como se detalla en la sección anterior.

4. PMCA para la propagación de priones *in vitro* en sustratos basados en homogeneizados de encéfalo

4.1. Preparación de sustratos para PMCA basados en homogeneizados de encéfalos

Con el objetivo de testar la capacidad de malplegar *in vitro* la PrP^C de encéfalo por parte de las semillas recombinantes generadas espontáneamente a lo largo de esta tesis doctoral, se realizaron reacciones de PMCA basadas en sustratos preparados con distintos homogeneizados cerebrales de ratones transgénicos TgVole (Fernández-Borges 2017, Eraña 2019), de corzo y de ciervo rojo. Esta metodología sirve para estimar el potencial infeccioso *in vivo* que podrían presentar las semillas testadas, puesto que la correlación entre estudios de PMCA *in vitro* y posteriores bioensayos *in vivo* ha sido previamente reportada (377). De esta manera, como paso intermedio entre los estudios *in vitro* con proteína recombinante y los bioensayos con animales para evaluar la infectividad de las semillas recombinantes espontáneas, se utilizaron homogeneizados de encéfalos de como sustrato de la reacción de PMCA. Los encéfalos utilizados para la preparación de sustrato fueron los siguientes:

Ratón TgVole (1X): Ratones transgénicos que expresan la PrP^C de topillo rojo con el polimorfismo 109I (Charles River Laboratories France) a niveles equivalentes a la expresión de la PrP^C endógena en ratón. Este modelo fue cedido por Glenn Telling, de la Universidad de Colorado y ha sido empleado previamente como modelo de gran susceptibilidad a la infección por priones en otros estudios (Fernández-Borges 2017 y Eraña 2019).

MATERIALES Y MÉTODOS

Corzo: Encéfalo de un ejemplar de *Capreolus capreolus* que expresa la PrP^C de cérvidos más común, homocigoto para 226Q.

Ciervo rojo: Encéfalo de un ejemplar de *Cervus elaphus* que expresa la PrP^C con la misma secuencia que el uapití, homocigoto para 226E.

En el caso de los encéfalos de TgVole, los animales se sacrificaron mediante inhalación de CO₂ y los encéfalos fueron perfundidos mediante punción cardiaca con 50 ml de solución de perfusión [PBS (HyClone sin iones de Ca y Mg) y 5 ml de EDTA (Sigma-Aldrich)] con el objetivo de eliminar la mayor cantidad de sangre de sangre posible. El encéfalo de ciervo rojo también pudo ser perfundido, utilizando hidrocloreto de ketamina como anestésico (Inalgen 1000) con medetomidina como analgésico (Domtor), se canuló la vena yugular y se pinzó la aorta descendente para dirigir la solución de perfusión principalmente al cerebro. Con la ayuda de una bomba peristáltica (Masterflex) se realizó la perfusión a través de la vena yugular con la misma solución de perfusión utilizada para ratones, hasta un máximo de 4 L. Una vez extraídos los cerebros perfundidos, éstos se homogenizaron al 10 % (p/v) en solución de conversión fría a la que se le añadió previamente el inhibidor de proteasas (*Complete™ Cocktail 1x*, Roche) con la ayuda de un homogeneizador de tipo Potter-Elvehjem (Fisherbrand). Por último, los homogeneizados para utilizar como sustratos para PMCA se alicuotaron convenientemente y se conservaron a -80 °C hasta su uso.

4.2. Propagación de priones recombinantes en PMCA para la determinación de la potencial infectividad *in vivo*

La propagación *in vitro* de priones mediante PMCA se realizó basándonos en el procedimiento descrito por Castilla y colaboradores (102, 378) que permite mimetizar *in vitro* el proceso de propagación priónica que tiene lugar *in vivo*, pero con una cinética acelerada. Esta técnica se utilizó para la evaluación de la potencial capacidad de infección de las rec-PrP de corzo y uapití malplegadas espontáneamente por PMSA. Para ello, se llevaron a cabo rondas seriadas de PMCA en las que las PrP malplegadas recombinantes en estudio se diluyeron 1:10 en el respectivo sustrato de interés. Se utilizaron tubos de 0.2 ml de pared fina (Axygen) para favorecer la penetración de las ondas ultrasónicas, a los que se les añadió en primer lugar partículas esféricas de zirconia – sílice de 1.0 mm de diámetro y posteriormente, 45 µl de sustrato de PMCA. Se utilizó un sonicador Misonix Q-700 con sistema de microplaca (Qsonica) programado para llevar a cabo ciclos de 30 min de incubación y 15 – 20 s de sonicación a una amplitud del 60 – 80 % durante 24 h. La temperatura a lo largo de todo el proceso se mantuvo entre 37 – 39 °C utilizando un baño de agua circulante (Thermo Scientific). En el caso de las PMCA con los sustratos de

MATERIALES Y MÉTODOS

encéfalos de corzo y ciervo rojo, tras una ronda de 24 h de PMCA se realizó una dilución 1:10 del producto de la primera ronda de PMCA en el mismo volumen de sustrato fresco para una segunda ronda seriada. De forma general, se incluyeron duplicados de cada semilla debido a la estocasticidad propia de la PMCA. Como controles de generación espontánea de PrP^{res} o de contaminación cruzada, se incluyeron tubos sin semilla recombinante que solo contenían sustrato y a los que se les añadió dextrano sulfatado al 0.05% en el caso de las rec-PrP^{res} obtenidas en presencia de éste, alcanzando así la misma cantidad final que presentan los tubos de experimentación debida a la adición de semillas recombinantes que contenían dicho cofactor.

5. Detección de PrP malplegada resistente a la digestión por proteasa o PrP^{res}

En este apartado se detallarán los distintos procedimientos bioquímicos realizados *in vitro* y orientados a la detección de PrP malplegada, excluyéndose las técnicas de análisis anatomopatológico que se detallarán en otra sección, aunque también representan otra manera de determinar la presencia de PrP malplegada.

5.1. Digestión de PrP malplegada mediante tratamiento con proteinasa K

La resistencia parcial al tratamiento con proteasas que presentan los priones (361) es una cualidad que ha sido tradicionalmente empleada para su detección. La digestión de las muestras que podrían contener PrP malplegada con proteinasa K (PK) es el método más utilizado dentro de este tipo de tratamientos, pudiéndose aplicar en cualquier tipo de muestras, ya sea procedente de técnicas de propagación *in vitro* como la PMCA o PMSA, cultivos celulares o tejidos y fluidos biológicos. Debido a que durante la realización de esta tesis doctoral se han utilizado tanto la PMSA como la PMCA como métodos de generación y propagación de PrP malplegadas, el formato de la digestión y las condiciones fueron adaptadas al tipo de muestras utilizadas:

Muestras de PMSA (para tinción de proteína total): Las muestras obtenidas tras propagación de semillas recombinantes de cérvidos, así como las generadas espontáneamente mediante PMSA se digirieron con el objetivo de evaluar la presencia de rec-PrP^{res} mediante electroforesis y tinción de proteína total. Para ello, un volumen de 400 – 500 µl de cada muestra obtenida fue digerida utilizando una concentración de PK (Roche) de 25 µg/ml. Las muestras se incubaron durante 1 h a 42 °C sin agitación en una estufa de laboratorio (Nahita). Pasado ese período de tiempo, las muestras se centrifugaron a 19 000 g durante 15 min a 4 °C (Centrífuga Sorvall Legend XTR, Thermo Scientific). El sobrenadante fue descartado y se procedió a lavar con 700 µl de PBS el material precipitado, para luego volver a centrifugar a 19 000 g durante 5 min más a 4 °C. Una vez más, el sobrenadante se descartó y esta vez el material precipitado fue

MATERIALES Y MÉTODOS

resuspendido en 15 μ l de solución de carga *NuPAGE* (Invitrogen Life Technologies) diluida previamente 1:3 en PBS. Las muestras obtenidas mediante la utilización de partículas esféricas con rec-PrP^{res} adsorbida como semillas se digirieron de igual forma, con la excepción del estudio de resistencia relativa a PK de algunas de las muestras, que se detalla más adelante en esta misma sección.

Muestras de PMSA (para Western blot): Para estudiar las características bioquímicas de las rec-PrP^{res} obtenidas espontáneamente o mediante propagación en PMSA, se hizo un Western blot para determinar reconocimiento por el anticuerpo monoclonal 12B2. Para ello, se extrajeron únicamente 10 μ l de cada muestra, los cuales se diluyeron 1:2 en PBS con 10 % de Sarkosyl (Sigma-Aldrich) y a continuación se digirieron utilizando una concentración de PK (Roche) de 25 μ g/ml 1 h a 42 °C en agitación constante de 450 rpm utilizando un *Thermomixer* (Eppendorf). Por último, el proceso de digestión se detuvo con la adición de 10 μ l de solución de carga *NuPAGE* (Invitrogen Life Technologies) y la presencia de rec-PrP^{res} se evaluó mediante electroforesis y *Western blot*.

Muestras procedentes de PMCA: 5 μ l de las muestras resultantes de PMCA se diluyeron 1:4 en PBS con 2% de Tween-20 (Sigma-Aldrich) + 2 % de Nonidet P40 (Sigma-Aldrich) + 5 % de Sarkosyl (Sigma-Aldrich). Las muestras se digirieron utilizando una concentración final de PK (Roche) de 170 μ g/ml durante 1 h a 56 °C en agitación constante de 450 rpm utilizando un *Thermomixer* (Eppendorf). El proceso de digestión se detuvo con la adición de 10 μ l de solución de carga *NuPAGE* (Invitrogen Life Technologies). Este procedimiento se aplicó para las muestras procedentes de sustratos basados en homogeneizados cerebrales de TgVole, corzo y ciervo rojo tras PMCA.

Muestras destinadas al ensayo de resistencia a PK: Algunas de las rec-PrP^{res} obtenidas fueron analizadas para determinar su resistencia relativa al tratamiento con proteasas en un ensayo cuyo objetivo era evaluar la existencia de rec-PrP^{res} con características distintivas, ya que distintos perfiles de resistencia a PK podrían asociarse a distintas cepas (213). Se preparó un *stock* exclusivo de PK (Roche) para estos ensayos, evitando así la potencial variabilidad debida a distintas preparaciones de PK. Tras ello, 400 μ l de cada muestra fueron digeridos añadiendo distintos volúmenes de PK (Roche) para alcanzar las concentraciones 25, 500, 1000, 2000 y 3000 μ g/ml. Tras ello, se operó de manera similar, incubando las muestras durante 1 h a 42 °C sin agitación en una estufa de laboratorio (Nahita), centrifugándolas a 19 000 *g* durante 15 min a 4 °C dos veces (Centrífuga Sorvall Legend XTR, Thermo Scientific) tras realizar entre ambas un lavado con PBS. El material precipitado fue resuspendido en 15 μ l de solución de carga *NuPAGE* (Invitrogen Life Technologies) diluida previamente 1:3 en PBS.

MATERIALES Y MÉTODOS

5.2. Detección de proteínas mediante electroforesis y tinción de proteína total

La evaluación de la presencia o ausencia de rec-PrP^{res} en las muestras obtenidas mediante PMSA en condiciones adaptadas a generación espontánea o en ensayos de propagación y tratadas con PK, se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) seguida de una tinción de proteína total con la solución de tinción *BlueSafe* (NZYtech). Para ello, las muestras digeridas y resuspendidas en solución de carga *NuPAGE* se hirvieron durante 10 min a 100 °C y se cargaron en geles de poliacrilamida del 4 – 12 % utilizando el sistema *NuPage® Novex® (NuPAGE Midi gel, Invitrogen Life Technologies)* y sometidos a electroforesis durante 1 h y 20 min (10 min a 70 V, 10 min a 110 V y 1h a 150 V). Tras la electroforesis se realizó la tinción de proteína total incubando el gel de electroforesis en solución de tinción de proteína total *BlueSafe* (NZYtech) durante 1 – 2 h a temperatura ambiente.

Para la visualización de muestras no sometidas a PMSA y no digeridas con PK, como es el caso de los sustratos preparados con las distintas proteínas recombinantes, se utilizó el mismo sistema de electroforesis bajo condiciones similares. A diferencia de las muestras digeridas, 10 µl de sustrato fueron diluidos en 10 µl de PBS, aunque en los apartados 7.1 y 8.1 se realizaron diluciones adicionales 1:2, 1:4 y 1:8 en PBS para la preparación de las muestras. A 40 µl de cada muestra se le añadieron 10 µl de solución de carga *NuPAGE* (Invitrogen Life Technologies), a excepción del sustrato diluido 1:8, al que se le añadieron 20 µl por ser la última muestra de la dilución seriada. Tras la preparación de todas las muestras, 10 µl de cada una de ellas fueron cargados en geles de poliacrilamida del 4 – 12 % y se procedió a realizar la electroforesis utilizando el sistema *NuPAGE® Novex® (NuPAGE Midi gel, Invitrogen Life Technologies)* con los mismos parámetros descritos anteriormente. Tras la electroforesis, se realizó la tinción de proteína total con *BlueSafe* (NZYtech) en las mismas condiciones que las especificadas anteriormente. En todos los geles se incluyeron además 3 µl de marcador de peso molecular (Nippon genetics).

5.3. Detección de proteínas mediante electroforesis y *Western blot*

La detección de las muestras obtenidas mediante PMCA y aquellas generadas espontáneamente en las condiciones iniciales de PMSA se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida e inmunodetección por *Western Blot*, tras su correspondiente digestión con PK. Una vez resuspendidas en solución de carga *NuPAGE*, las muestras se hirvieron durante 10 min a 100 °C. Se utilizaron 15 µl de cada muestra digerida y 10 µl de las muestras no digeridas para la separación electroforética de proteínas. En todos los casos dicha separación se realizó mediante el sistema *Criterion TGX gel 4 – 12 % (Bio-Rad)*. En todos los geles se incluyeron además 3 µl de marcador de peso molecular (Nippon genetics). Tras la separación, las muestras fueron transferidas utilizando membranas adsorbentes de difluoruro de

MATERIALES Y MÉTODOS

polivinilideno (PVDF, del inglés *PolyVinylidene DiFluoride*) (*Trans-Blot Turbo Transfer Pack PVDF*, Bio-rad) mediante electrotransferencia utilizando el equipo *Trans-Blot Turbo System* (Bio-Rad). El bloqueo de la membrana se realizó utilizando solución de bloqueo [PBS (Fisher Bioreagents), 5 % (p/v) leche deslipidada, 0.05 % (v/v) Tween-20 (Sigma-Aldrich)] en la que se incubaron las membranas durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación orbital suave. A continuación, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios 12B2 [dilución 1:2500 en PBS con Tween-20 al 0.05 % (v/v) y leche deslipidada al 0.1 % (p/v)] (Central Veterinary Institute Wageningen) o Bar224 [dilución 1:1000 en PBS con Tween-20 al 0.05 % (v/v) y leche deslipidada al 0.1 % (p/v)] (Cayman Chemical). Se utilizó el anticuerpo secundario policlonal anti-IgG de ratón recombinante conjugado con peroxidasa de rábano (1:3000 en PBS con Tween-20 al 0.05 % (v/v) y leche deslipidada al 0.1 % (p/v), m-IgGk BP-HRP, Santa Cruz Biotechnology) para ambos anticuerpos primarios. Tras la incubación con cada anticuerpo durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación orbital suave, se realizaron un lavado de 10 min y tres más de 5 min con una solución de PBS (Fisher Reagents) + 0.05 % (v/v) de Tween-20 (Sigma-Aldrich). Los resultados fueron evaluados mediante la visualización de bandas de PrP^{tes} por quimioluminiscencia, utilizando el kit *Super Signal West Pico* (Thermo Scientific Pierce) para revelar la membrana. La visualización y toma de imágenes digitales se llevó a cabo utilizando el equipo *FluorChem Q* (Alpha Innotech) y el software *Alphaview* (Alpha Innotech). En las ocasiones en las que fue necesario un análisis semicuantitativo de la intensidad de fluorescencia de las muestras analizadas, se utilizó la herramienta informática *ImageJ*.

6. Estudios de infectividad *in vivo*

Para confirmar que las proteínas recombinantes malplegadas cumplen con las características de priones *bona fide* evaluándose evaluó su infectividad *in vivo* a través de bioensayos. Por ello, aunque la gran mayoría de la metodología aplicada en esta tesis doctoral ha sido realizada *in vitro*, fueron necesarias inoculaciones en un modelo animal para comprobar que el material recombinante generado de manera espontánea era capaz de dar lugar a una enfermedad priónica *in vivo*.

6.1. Modelos de experimentación y seguimiento

Con el objetivo de inducir enfermedad priónica en los modelos de experimentación, se utilizaron ratones transgénicos TgVole (1X) (383, 400) de entre 4 y 6 semanas de edad. Estos animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (100 mg/kg) /xilacina (10 mg/kg) administrada de forma intraperitoneal o bien con isoflurano (Isovet), utilizando el equipo de administración Somnosuite® (Kent Scientific) y posteriormente inoculados de forma intracerebral en un área cercana al hipocampo utilizando una aguja hipodérmica de calibre 27 G con 15 - 20 µl del producto de PMSA de interés diluido 1:10 en PBS.

MATERIALES Y MÉTODOS

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

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

Debido a la implicación de distintas instituciones colaboradoras en los estudios *in vivo*, los protocolos de inoculación y posterior evaluación de los signos clínicos pueden variar ligeramente según la institución, describiéndose en este apartado el utilizado con más frecuencia. En todos los casos, cuando la progresión de la enfermedad era evidente se procedió a la eutanasia de los animales por razones éticas mediante dislocación cervical o inhalación de CO₂ para la toma de muestras biológicas. Tras la extracción del encéfalo completo, se realizó un corte longitudinal en el cerebro de manera que se separaron los dos hemisferios. Uno de ellos se congeló y almacenó a -80 °C para su posterior examen bioquímico mediante *Western blot* mientras el otro se fijó inmediatamente en paraformaldehído 4% (Alfa Aesar) para estudios anatomopatológicos.

6.2. Entidades colaboradoras y cumplimiento de las normativas éticas

Los estudios *in vivo* descritos a lo largo de esta tesis doctoral no hubieran sido posible sin la inestimable participación de diversas entidades colaboradoras a las que debemos agradecer tanto sus servicios como su activa participación en este proyecto.

De esta manera, la Universidad de Santiago y el Centro de Biomedicina Experimental (CEBEGA) adscrito a dicha entidad, participaron en la inoculación y posterior estabulación de parte de los ratones transgénicos TgVole, agradeciendo al Dr. Jesús Rodríguez Requena su papel en esta parte del estudio. Dicho estudio se aprobó por el Comité de Ético para la Experimentación Animal de la Universidad de Santiago (número de permiso 15005/16/006) y se realizó de acuerdo con las recomendaciones para el cuidado y uso de animales de experimentación acorde a la legislación nacional española (R. 1201/05).

MATERIALES Y MÉTODOS

Por su parte, las inoculaciones y la posterior estabulación del resto de los ratones transgénicos TgVole corrieron a cargo del Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (Neiker-Tecnalia), siendo la Dra. Mariví Geijo la principal responsable de dicha actividad. Este estudio se aprobó por el Órgano Encargado del Bienestar Animal y Comité Evaluador (OEBA-CE) de Neiker-Tecnalia (número de permiso NEIKER-OEBA-2017-006) y se realizó de acuerdo con las recomendaciones para el cuidado y uso de animales de experimentación acorde a la legislación nacional española (R. 1201/05).

7. Estudios anatomopatológicos

Todos los análisis anatomopatológicos de los ratones descritos a lo largo del trabajo fueron realizados en el Centre de Recerca en Sanitat Animal (IRTA-CReSA), agradeciendo al Dr. Enric Vidal, a M^a Sierra Espinar y a Samanta Giler el papel que han desempeñado en dichas actividades.

7.1. Detección de PrP^{res} y toma de imágenes

Los cerebros procedentes de los ensayos de infectividad *in vivo* fijados en paraformaldehído 4% (Alfa Aesar) se deshidrataron a través de incubaciones en soluciones con concentraciones crecientes de alcohol y a través de xileno. Tras ello, se realizaron sobre los cerebros cuatro cortes laterales que se orientaron tal y como aparece en la Figura 8 y finalmente se incluyeron en parafina utilizando para ello un inclusor de parafina (Leyca TP1020) y se mantuvieron a 36 °C en una estufa de laboratorio (Nahita) durante una noche para secar completamente los tejidos. Tras ello, se utilizó un microtomo (Leyca RM2145) y un baño histológico con H₂O destilada a 36 °C para cortar secciones de 4 µm de grosor que se montaron por duplicado sobre portaobjetos de vidrio convencionales para su evaluación morfológica tras la tinción con hematoxilina-eosina (H/E) y sobre portaobjetos de vidrio recubiertos con 3-trietoxisililpropilamina cuando se destinaban a estudios inmunohistoquímicos (IHQ).

El primer paso del estudio inmunohistoquímico fue la eliminación de parafina de las muestras, realizada utilizando una batería de distintos alcoholes dispuestos en un teñidor automático (LEYCA *Autostainer XL*). Tras dos lavados con H₂O destilada, se llevó a cabo el desenmascaramiento de los epítomos de PrP^{Sc}, comenzando por una inmersión de 5 minutos en ácido fórmico 5 % (p/v) (Fisher) y seguido por una digestión con una solución de 4 µg/ml de PK (Roche) durante 15 minutos a 37 °C, realizando sendos lavados con H₂O destilada entre ambos pasos. A continuación, las muestras emplazadas en los portaobjetos de vidrio fueron tratadas con una solución 1:10 de citrato (*Target Retrieval Solution*, Dako) para asegurar un pH bajo y llevadas a ebullición utilizando una olla a presión (Monix). Las peroxidasas endógenas de las muestras se bloquearon mediante la inmersión en una solución de metanol

MATERIALES Y MÉTODOS

durante 20 minutos y se incubaron durante toda la noche a 4 °C en presencia del anticuerpo primario 2G11 (Prionics AG, 1:1000).

Al día siguiente, las muestras fueron atemperadas y se incubaron durante 30 minutos con el sistema DAKO EnVision (polímero conjugado a los anticuerpos secundarios con peroxidasa junto con la 3,3'diaminobencidina). Tras ello, el revelado se realizó mediante la inmersión de los portaobjetos de vidrio en una solución de DAB y H₂O₂ hasta visualizar un marcaje que señala la presencia de depósitos de PrP^{Sc}. Una vez los tejidos fueron marcados, se realizó un contraste con hematoxilina (Mayer) y se procedió a la deshidratación de estos utilizando una batería de distintos alcoholes dispuestos en un teñidor automático (LEYCA *Autostainer XL*) y a su posterior montaje con una resina acrílica con base de xileno (DPX, Casa Álvarez). Finalmente, las muestras fueron observadas utilizando un microscopio óptico de fluorescencia.

7.2. Evaluación y elaboración del perfil lesional

Tras la toma de imágenes utilizando el microscopio óptico de fluorescencia, se analizaron las siguientes secciones encefálicas: corteza piriforme, hipocampo, corteza occipital, corteza temporal, corteza parietal, corteza frontal, estriado, tálamo, hipotálamo, mesencéfalo, médula oblonga, núcleos cerebelosos, vermis y corteza cerebelosos (Figura 7). En los ensayos IHQs se buscaron depósitos de proteína mal plegada, minimizando el marcaje de la PrP^C e identificando patrones de acumulación específicos de la PrP^{Sc}: patrón punteado, granular fino, intraneuronal, linear (axones), placas (extracelular), estrellado (células gliales) y perivascular.

La elaboración del perfil lesional de los confórmeros de proteína recombinante malplegada se realizó mediante la evaluación de las áreas anteriormente descritas. Dicha evaluación consistió en un sistema de puntuación del 0 al 5 acorde al grado de severidad de la lesión, atribuyendo un 0 cuando no había lesión, 1 si la lesión era muy leve y 5 si el grado de severidad era muy elevado. Posteriormente, los resultados de dicha evaluación de representaron de manera visual sobre un esquema con los cuatro cortes encefálicos en los que cada uno de ellos se dividía a la mitad para representar las lesiones espongiiformes (color rosa) y los depósitos de PrP^{Sc} (color azul).

MATERIALES Y MÉTODOS

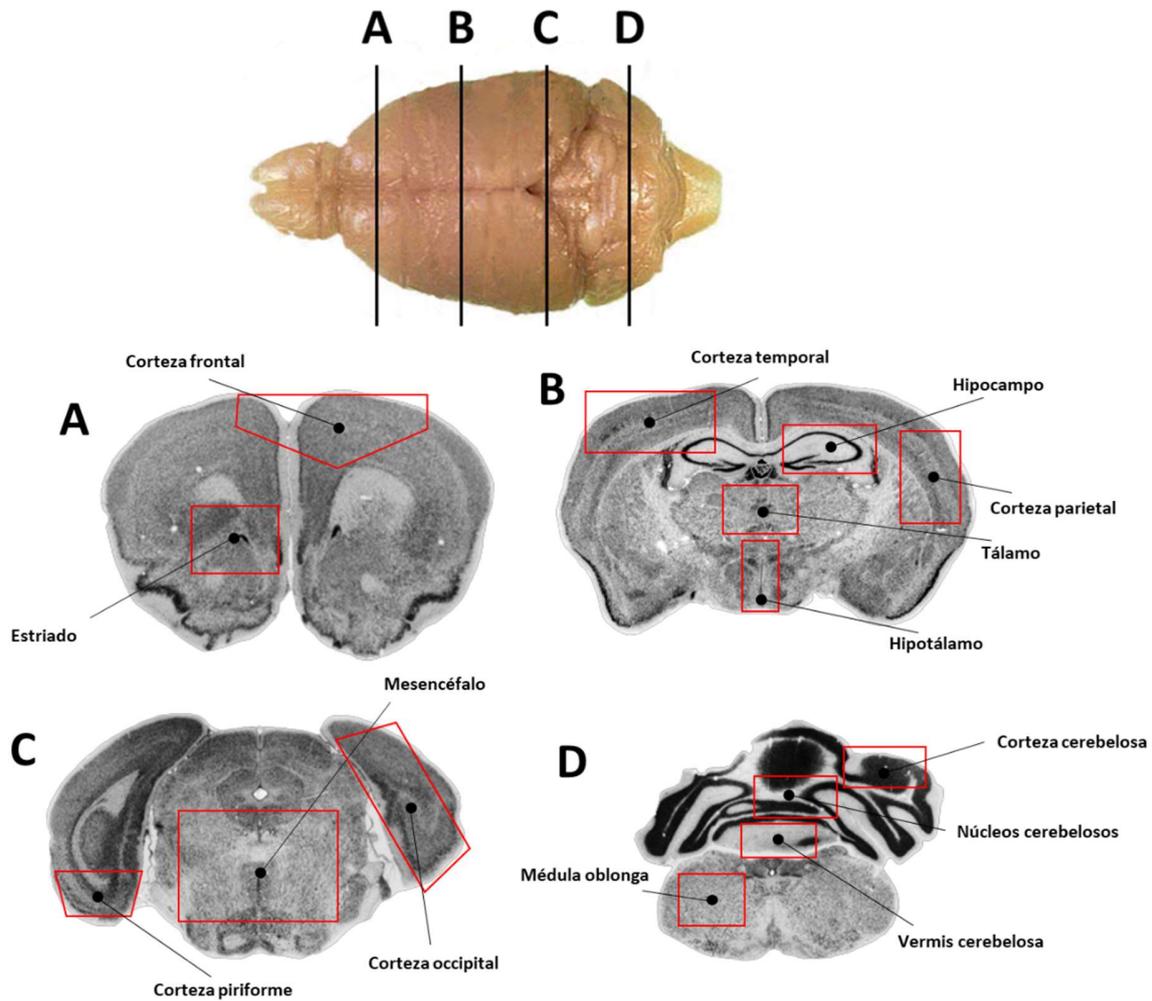


Figura 7. Secciones de encéfalo de ratón para la evaluación anatomopatológica de las características de cepa. La realización de 4 cortes (A, B, C y D) transversales a los cerebros incluidos en parafina permite el estudio de distintas áreas marcadas en rojo: corteza piriforme, hipocampo, corteza occipital, corteza temporal, corteza parietal, corteza frontal, estriado, tálamo, hipotálamo, mesencéfalo, médula oblonga, núcleos cerebelosos, vermis cerebeloso y corteza cerebelosa. Modificado de Bruce 1991.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Malplegamiento espontáneo *in vitro* de las PrP recombinantes de corzo y uapití

Actualmente la enfermedad priónica más frecuente y extendida por el mundo, la caquexia crónica, afecta de forma natural a un total de 8 especies de cérvido, tanto salvajes como en cautividad. Si bien no se ha reportado caso alguno en el que esta enfermedad haya saltado la barrera de transmisión interespecies, existen estudios que demuestran que dicha transmisión es factible, aunque improbable, mediante especies intermedias (401). Además, la emergencia de nuevas cepas abre la posibilidad de la aparición de alguna cepa inédita capaz de infectar humanos (402). Esta posibilidad es especialmente alarmante en el caso de la caquexia crónica debido al gran número de animales infectados y a la gran variabilidad que presenta la PrP de la familia *Cervidae* (403), que pueden facilitar la formación de múltiples cepas. Es por ello por lo que el estudio de la variabilidad de cepa asociada al malplegamiento espontáneo de la PrP^C para dar lugar a su isoforma patógena es de especial interés en el caso de los cérvidos y la caquexia crónica.

En este contexto, la PMSA aparece como la técnica idónea para el estudio del efecto de los distintos polimorfismos de la PrP de cérvido sobre la capacidad de malplegamiento y la aparición de diferentes características de cepa. Esta nueva tecnología induce el malplegamiento espontáneo de PrP recombinantes de diversas especies y la generación de diferentes cepas *de novo* ((383); Erana et al, 2022 – Charla Gottingen) (Perez-Castro et al, 2021 – charla Jaca). Así, con el objetivo de determinar la metodología de PMSA más eficiente para la obtención sistemática de PrP recombinantes de cérvido malplegadas espontáneamente, procedimiento que anteriormente ha sido realizado con rec-PrP de otras especies, como topillo rojo, ratón y oveja, se seleccionaron como modelo experimental los dos genotipos más frecuentes en la naturaleza y, por ende, más estudiados, las PrP recombinantes de corzo y uapití.

1.1.- Obtención de PrP recombinantes de corzo y uapití

Mediante los protocolos detallados en la sección anterior, se extrajo DNA genómico de encéfalo de un ratón transgénico que expresa la PrP de ciervo mula, el Tg1536 (404), a partir del cual se clonó el ORF de la PrP en un vector de expresión mediante recombinación homóloga. Tras comprobar que la secuencia de nucleótidos era la deseada y mediante mutagénesis dirigida secuencial en dos pasos, se obtuvo el vector de expresión que contenía el ORF de la PrP de uapití, gracias a que ambas secuencias nucleotídicas difieren únicamente en un nucleótido del codón 226 (CAG en el caso del ciervo mula y GAG en el caso del uapití).

RESULTADOS

Cabe mencionar que de ahora en adelante la PrP de ciervo mula pasará a denominarse PrP de corzo debido a que en dicha especie no se ha descrito ningún polimorfismo en esta proteína, poseyendo la misma secuencia aminoacídica que la variante más frecuente en el caso del ciervo mula. También a partir de ahora la secuencia aminoacídica de la PrP asociada al corzo pasará a considerarse como la secuencia de referencia al tratarse de la más frecuente en cérvidos en general. De este modo, el resto de PrP de cérvidos descritas en la naturaleza e incluidas en este estudio se representarán como variantes, siempre en relación con la PrP de corzo. Así, en los casos de las PrP de corzo y uapití, las dos utilizadas como modelo experimental para la optimización y análisis de procesos, se representarán bien por el nombre del animal en cuestión, o bien refiriéndose a la posición aminoacídica que las distingue, es decir, Q226Q y Q226E, respectivamente. De esta manera queda patente la única y fundamental diferencia entre ambas proteínas, la presencia del aminoácido glutamina o del aminoácido glutamato en el residuo 226 (Figura 1).

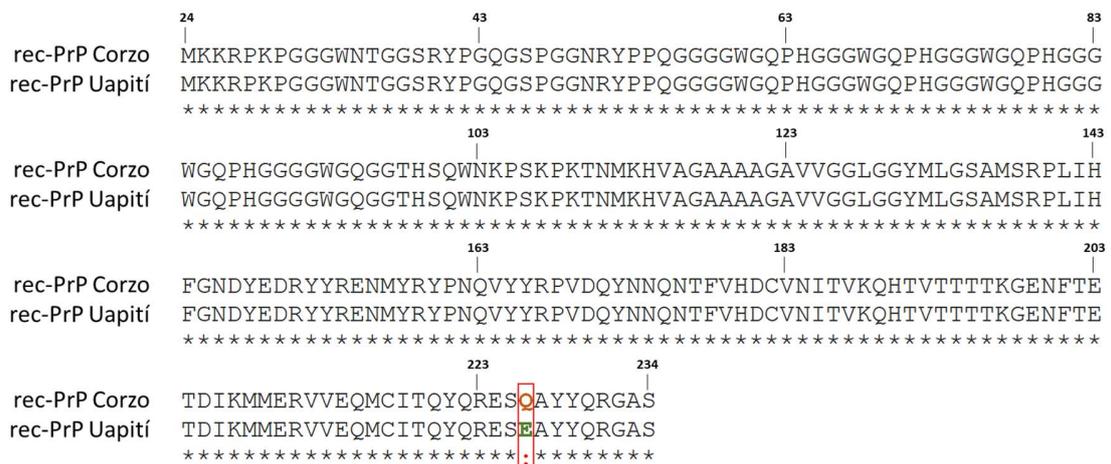


Figura 1. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las PrP recombinantes de corzo y uapití. Nótese cómo la única diferencia entre ambas secuencias radica en el residuo 226, donde la rec-PrP de corzo presenta un aminoácido glutamina (Q), marcado en naranja, mientras que la rec-PrP de uapití muestra un aminoácido glutamato (E), marcado en verde. Sobre las secuencias se muestra el número de los residuos, desde la posición 24 a la 234 de las rec-PrP. Bajo las secuencias se representa el grado de homología en cada residuo. Así, un asterisco (*) representa una homología del 100%, es decir, el mismo aminoácido se encuentra en la misma posición en las dos secuencias, mientras que dos puntos (:) representan un cambio conservativo, es decir, las secuencias difieren en el aminoácido presente en esa posición, pero ambos aminoácidos tienen propiedades fisicoquímicas similares.

1.2.- Determinación de una metodología eficiente para el malplegamiento espontáneo *in vitro* de las PrP recombinantes de corzo y uapití

Los estudios previos centrados en el malplegamiento espontáneo de rec-PrP mediante PMSA concluyeron que, además de los parámetros físicos de temperatura y agitación intrínsecos a la técnica, existe una serie de componentes necesarios. Estos son la solución de conversión, compuesta por PBS,

RESULTADOS

sales y detergente, y las esferas de vidrio (Erana et al, 2022 – charla Gottingen). A estos componentes habría que sumarles también el cofactor, dextrano sulfatado, cuya adición, aunque no estrictamente necesaria, favorece el evento de malplegamiento de la rec-PrP (Perez-Castro et al, 2021 – charla Jaca). Todos estos elementos fueron analizados, estableciendo unos parámetros óptimos de manera que permiten un malplegamiento eficaz de las PrP recombinantes de las diferentes especies estudiadas ((383); Perez-Castro et al, 2021 – charla Jaca; Erana et al, 2022 – charla Gottingen). Mientras que dichos parámetros óptimos han sido coincidentes en la mayoría de estos elementos, en el caso de las esferas de vidrio se han detectado fluctuaciones en la eficiencia del malplegamiento espontáneo entre rec-PrP de diferentes especies, siendo la causa aparente de dichas variaciones la superficie total de vidrio presente en el sistema y la distinta capacidad de unión a la misma que presentan las distintas rec-PrP evaluadas previamente en el laboratorio.

1.2.1.- Estudio del efecto de la superficie de vidrio en el malplegamiento espontáneo *in vitro* de las PrP recombinantes de corzo y uapití

Partiendo de los precedentes descritos, se procedió al análisis del efecto de la superficie de vidrio en el malplegamiento espontáneo de las rec-PrP de corzo y uapití. Para ello se prepararon los sustratos que contenían la misma concentración de las PrP recombinantes de cada especie, solución de conversión y dextrano sulfatado, a los que se añadieron esferas de vidrio. Con el fin de abarcar un espectro de superficies de vidrio más amplio, se añadieron diferentes cantidades de esferas de dos tamaños distintos, contando con esferas de 0,1 mm de diámetro y esferas de 1 mm de diámetro, tal y como se puede apreciar en la figura 2a. Así, y sin contar con el control sin esferas añadidas, el rango de superficie de vidrio estudiado abarcaba desde $15,71 \text{ mm}^2$ ($5\pi \text{ mm}^2$) hasta $15707,96 \text{ mm}^2$ ($5000\pi \text{ mm}^2$). Para comprobar que las posibles variaciones en la eficacia del malplegamiento espontáneo por PMSA relacionadas con las esferas de vidrio dependía únicamente de la superficie de estas y no de su tamaño, se incluyeron 3 cantidades de cada tipo de esfera de forma que la superficie disponible representada fuera coincidente (Figura 2a). De esta manera, seis réplicas técnicas para cada una de las cantidades de esfera de cada tipo a analizar se sometieron a una ronda de PMSA de 24 horas. En la figura 2b se puede observar cómo, en el caso de las esferas de 0,1 mm de diámetro, el malplegamiento espontáneo de las rec-PrP de corzo y uapití se producía únicamente en presencia de 0,01 g de esferas ($50\pi \text{ mm}^2$) y con una menor eficiencia que la observada al añadir diferentes cantidades de esferas de 1 mm. Esta eficiencia de malplegamiento espontáneo se basa en la cantidad de réplicas técnicas en las que es posible detectar rec-PrP^{res} mediante electroforesis y tinción de proteína total previa a la digestión con PK. En el caso de las esferas de 1 mm de

RESULTADOS

diámetro, se pudo apreciar un malplegamiento espontáneo de las PrP recombinantes de corzo y uapití en todos los casos en los que había esferas en el sistema, alcanzándose las máximas eficiencias de malplegamiento en las réplicas técnicas a las que se añadió 0,5 g (25π mm²) y 1 g (50π mm²) de esferas de vidrio (Figura 2b). Así, la máxima eficacia de malplegamiento se concentra en el rango de superficie de entre 25π y 50π mm², siendo más eficiente al añadir esferas de 1 mm de diámetro que, además, favorecen el malplegamiento también a superficies mayores, a diferencia de las esferas de 0,1 mm de diámetro (Figura 2c).

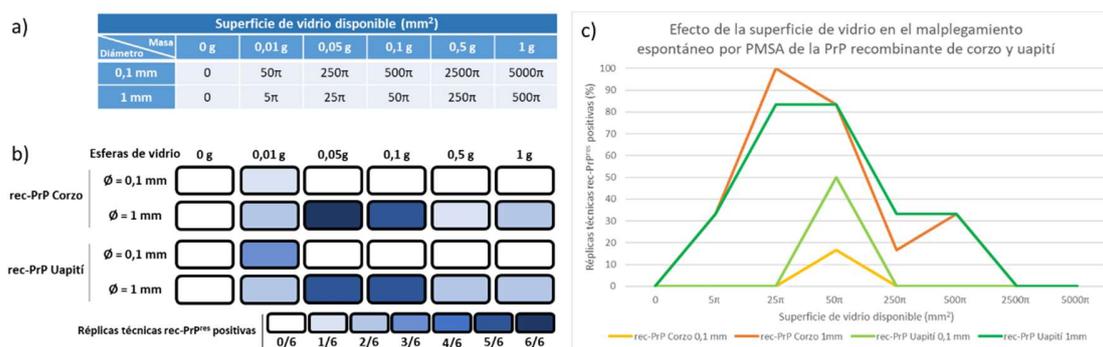


Figura 2. Efecto de la superficie de vidrio en el malplegamiento espontáneo por PMSA de las PrP recombinantes de corzo y uapití. **a)** Correlación entre masa de esferas de vidrio (g) y su superficie (mm²) en función del diámetro de la esfera. Para mejor comprensión, el valor de las diferentes superficies ha sido expresado en función del número π . **b)** Malplegamiento espontáneo por PMSA de las rec-PrP de corzo y uapití en función de la cantidad de esferas añadidas (0 – 1 g) y de su diámetro (0,1 mm o 1 mm). Se llevó a cabo una única ronda de PMSA de 24 horas, sin semilla, tras la que se observó una mayor eficiencia de malplegamiento espontáneo tanto de la rec-PrP de corzo como de uapití en las réplicas técnicas a las que se les añadieron esferas de 1 mm de diámetro, especialmente aquellas a las que se les añadió 0,05 g y 1 g de esferas de vidrio. **c)** Malplegamiento espontáneo por PMSA de las rec-PrP de corzo y uapití en función de la superficie de vidrio aportada por esferas de diferentes diámetros. En esta representación gráfica del proceso descrito se puede observar una mayor eficiencia de malplegamiento espontáneo de las rec-PrP de corzo y uapití cuando está presente en el sistema entre 25π mm² y 50π mm² de vidrio en forma de esferas de 1 mm de diámetro. Estas superficies se correlacionan con las cantidades de 0,05 g y 1 g ya comentadas, respectivamente. Cabe destacar que, en el caso de las esferas de 0,1 mm de diámetro, únicamente se detectó rec-PrP^{res} y, por tanto, malplegamiento espontáneo al añadir 50π mm² de vidrio, lo que en estas esferas de vidrio se corresponde con 0,01 g.

Esta inesperada discrepancia entre eficiencias de malplegamiento espontáneo y superficie de vidrio en función del tamaño de las esferas podría explicarse por la diferente capacidad de los distintos materiales para adsorber PrP en la superficie (405). Este hecho se observó durante la optimización de la PMSA utilizando la proteína priónica recombinante del topillo rojo, siendo el vidrio el material con mayor tasa de adsorción de rec-PrP. Si bien la interacción entre la PrP y la superficie de vidrio se considera el responsable de una mayor eficacia en el malplegamiento espontáneo de la rec-PrP, en realidad se trata de un arma de doble filo, ya que una cantidad de superficie de vidrio muy elevada podría adsorber la

RESULTADOS

totalidad de la rec-PrP presente en el sustrato inhibiendo su malplegamiento por ausencia de proteína en el medio líquido. De este modo, las esferas de 0,1 mm de diámetro podrían presentar una mayor cantidad de impurezas, irregularidades y fragmentos de vidrio derivados del proceso de producción de las propias esferas, presentando así una superficie mayor que la teórica, lo que implicaría una adsorción mayor de la rec-PrP. Para comprobar esto se diseñó un experimento que permitiese comparar la cantidad de rec-PrP adsorbida por superficie teórica de vidrio en función del tamaño de la esfera. Se seleccionó la superficie de vidrio con la que se observaba el máximo malplegamiento al añadir esferas de 0,1 mm de diámetro, $50\pi \text{ mm}^2$, los que se correspondía con 0,01 g y 0,1 g en el caso de las esferas de 1 mm de diámetro (Figura 2a). Como la cantidad de desperfectos asociados a las esferas que podrían añadir más superficie de vidrio al sistema deberían ser proporcionales a la cantidad de esferas añadidas, se añadió otra condición al experimento aumentando 10 veces la superficie de vidrio de ambos tipos. De esta manera se podría analizar la adsorción de la rec-PrP de corzo y uapití a $50\pi \text{ mm}^2$ y $500\pi \text{ mm}^2$ de vidrio, pudiendo comparar también la adsorción en función de los gramos de esfera añadidos al contar con el valor común de 0,1 g. Estas cantidades de esferas se incubaron con rec-PrP de corzo y uapití durante 24 horas a temperatura ambiente con agitación orbital, tomando muestras a diferentes tiempos (0 h, 1 h, 4 h, 24 h), las cuales se analizaron por electroforesis y tinción de proteína total con el objetivo de analizar la cantidad de rec-PrP disponible y, por extensión, la cantidad de rec-PrP adsorbida a las esferas (Figura 3a). Mediante un análisis densitométrico se pudo cuantificar el porcentaje de rec-PrP no adsorbido (Figura 3b). Se incluyó una muestra control para cada proteína a la que no se añadieron esferas para comparar la pérdida de rec-PrP derivada de la adsorción a la superficie de vidrio con la pérdida de rec-PrP como consecuencia de la agregación propia de la proteína y su adsorción a las paredes del tubo en función del tiempo y a temperatura ambiente. La concentración de rec-PrP de corzo en el control sin esferas tras 24 h de incubación fue del 84% mientras que la de rec-PrP de uapití fue del 73%. Como se puede observar en la figura 3, la pérdida de concentración de rec-PrP en el medio es dependiente de la superficie de vidrio, con una mayor pérdida a $500\pi \text{ mm}^2$ que a $50\pi \text{ mm}^2$ y no de la cantidad y tamaño de esferas añadidas. No obstante, se puede observar cómo la disminución de concentración de rec-PrP ocurre de forma más rápida (en las primeras horas de la incubación) cuando las esferas de 0,1 mm de diámetro están presentes en el medio que en el caso de las esferas de 1 mm de diámetro. Además, en todos los escenarios analizados, la rec-PrP de uapití ha experimentado una mayor pérdida de concentración que la rec-PrP de corzo, independientemente del tipo de esfera y superficie de vidrio añadida (Figura 3c), confirmando que las diferencias aminoacídicas pueden tener un impacto en la adsorción y, por tanto, en la eficiencia de malplegamiento, tal y como se ha observado con la PrP de otras especies.

RESULTADOS

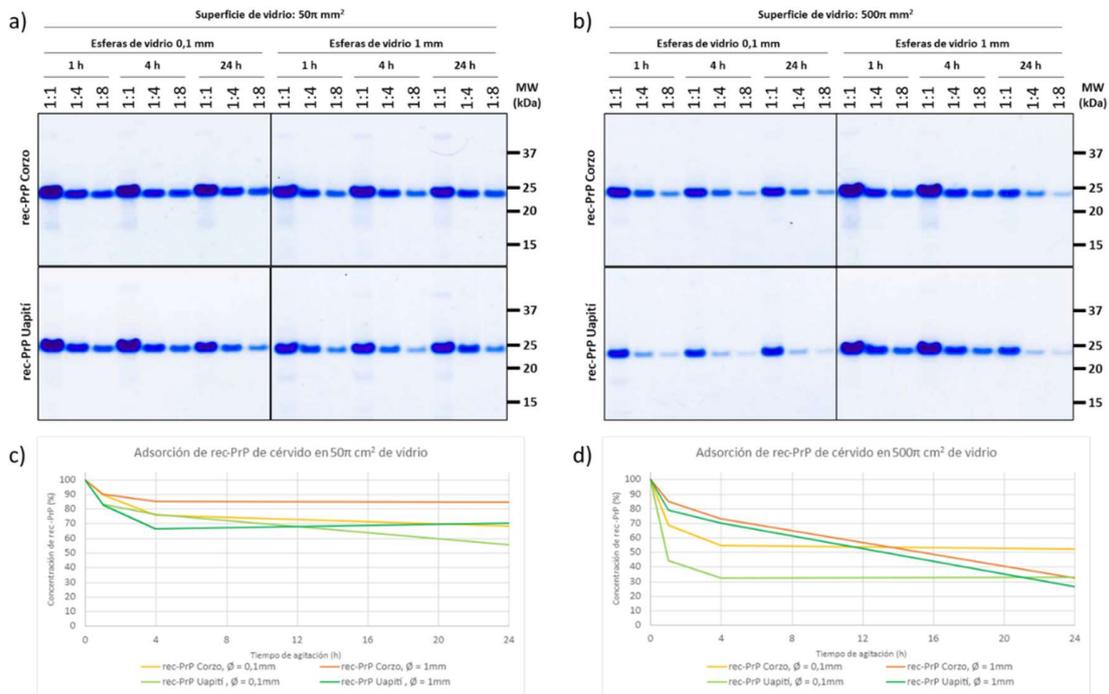


Figura 3. Adsorción de PrP recombinante de corzo y uapití a la superficie de las esferas de vidrio en función de su diámetro. **a)** Electroforesis y tinción de proteína total de las rec-PrP de corzo y uapití presentes en el medio líquido tras 1, 4 y 24 horas de incubación con una cantidad de esferas de vidrio de 0,1 mm de diámetro y de 1 mm de diámetro equivalentes a 50π mm² de superficie. La incubación se llevó a cabo en un agitador rotatorio, a temperatura ambiente. Para facilitar el análisis del resultado, cada muestra fue diluida 1:1, 1:4 y 1:8 en la solución de carga antes de la electroforesis. Tras la tinción de proteína total se pudo observar una disminución de la cantidad de rec-PrP en el medio líquido en función del tiempo, indicativo de su adsorción a la superficie de las esferas de vidrio. **b)** Electroforesis y tinción de proteína total de las rec-PrP de corzo y uapití presentes en el medio líquido tras 1, 4 y 24 horas de incubación con una cantidad de esferas de vidrio de 0,1 mm de diámetro y de 1 mm de diámetro equivalentes a 500π mm² de superficie. De procedimiento idéntico al anterior, en este caso se puede observar una disminución de la cantidad de rec-PrP presente en el medio líquido mucho más acusada, debida al incremento de la superficie de vidrio presente en el sistema. **c)** Disminución de la concentración de rec-PrP de corzo y uapití en el medio líquido tras su incubación con una cantidad de esferas de vidrio de 0,1 mm de diámetro y de 1 mm de diámetro equivalentes a 50π mm² de superficie. Se llevó a cabo la cuantificación de la rec-PrP presente en el medio líquido de cada muestra evaluada por electroforesis y tinción de proteína total mediante un análisis densitométrico de la intensidad de señal de la banda correspondiente a la dilución 1:4. Al representar esta disminución de la concentración expresada como porcentaje frente al tiempo de incubación (h), se observa una pérdida de entre el 20 y el 40% de la rec-PrP total tras 24 horas de agitación con esferas de vidrio equivalentes a 50π mm² de superficie. Esta disminución es más acusada en el caso de la rec-PrP de uapití independientemente del diámetro de las esferas añadidas. Por otra parte, en ambas rec-PrP se observa una mayor disminución de sus concentraciones en las primeras horas de agitación al incubarlas con esferas de 0,1 mm de diámetro. **d)** Disminución de la concentración de rec-PrP de corzo y uapití en el medio líquido tras su incubación con una cantidad de esferas de vidrio de 0,1 mm de diámetro y de 1 mm de diámetro equivalentes a 500π mm² de superficie. En este caso se observa una pérdida de rec-PrP en el medio mayor, de entre el 40 y el 70%. De nuevo, la pérdida de rec-PrP fue mayor en el caso de la rec-PrP de uapití y se observó una disminución de la concentración de ambas rec-PrP más acusada en las primeras horas de agitación al incubarlas con esferas de 0,1 mm de diámetro.

RESULTADOS

1.2.2.- Comparación de dos metodologías *in vitro* basadas en pases seriados para la obtención de PrP recombinantes de corzo y uapití malplegadas espontáneamente

A la vista de los resultados anteriores se seleccionó una superficie de vidrio equivalente a 50π mm² en forma de esferas de 1 mm de diámetro como parámetro óptimo para el malplegamiento espontáneo de las rec-PrP de cérvido. Sin embargo, contemplando la posibilidad de que fuesen necesarias varias rondas seriadas de PMSA para la obtención de rec-PrP malplegada espontáneamente *in vitro* y, teniendo en cuenta el fenómeno de la adsorción de la proteína en la superficie de vidrio de las esferas, se plantearon dos posibilidades para llevar a cabo dichas rondas seriadas.

La primera posibilidad se correspondía con la metodología estándar para llevar a cabo este tipo de procedimientos. En ella se haría un primer pase para la obtención de rec-PrP^{res} como los anteriormente descritos, es decir, sometiendo una muestra consistente en sustrato basado en proteína recombinante, solución de conversión y dextrano sulfatado a la interacción con esferas de vidrio durante una ronda de PMSA de 24 h. A partir de este punto, las rondas posteriores se harían mediante dilución seriada añadiendo un volumen (dilución 1:10) del producto de la primera ronda de PMSA a un nuevo sustrato con esferas de vidrio frescas, no sometidas previamente a PMSA.

La segunda posibilidad se basa en la adsorción de la rec-PrP a las esferas de vidrio y en la suposición de que el malplegamiento espontáneo comienza en su superficie. De esta manera, mientras que la primera ronda de PMSA sería idéntica a la anterior, las rondas posteriores se llevarían a cabo retirando todo el sobrenadante resultante, manteniendo las esferas utilizadas y con rec-PrP adsorbida a ellas, sobre las que se añadiría un sustrato nuevo.

Siguiendo estos dos planteamientos, se hicieron dos rondas seriadas de PMSA utilizando las rec-PrP de corzo y uapití, con tres réplicas técnicas por cada tipo de rec-PrP y protocolo empleado. El resultado de ambas rondas se analizó por electroforesis y tinción de proteína total tras su digestión con PK. Como se puede apreciar en la figura 4, se obtuvo un 100% de eficacia en el malplegamiento espontáneo de las rec-PrP sometidas a PMSA en la primera ronda. Sin embargo, se puede apreciar una diferencia sutil en la intensidad de señal de rec-PrP^{res} obtenida en la segunda ronda utilizando el procedimiento basado en diluciones cuando se compara con la señal obtenida en la segunda ronda utilizando la metodología basada en las esferas con rec-PrP adsorbida (Figura 4). Por este motivo, se seleccionó el protocolo de ronda

RESULTADOS

seriada basada en diluciones 1:10 como metodología estándar de obtención de rec-PrP malplegadas *in vitro*.

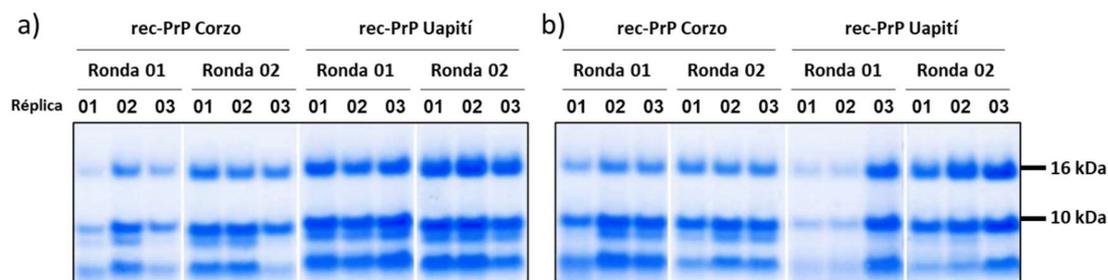


Figura 4. Comparación de dos metodologías *in vitro* basadas en rondas seriadas para la obtención de PrP recombinantes de corzo y uapití malplegadas espontáneamente. a) Malplegamiento espontáneo *in vitro* por PMSA mediante rondas seriadas basadas en volúmenes líquidos de la ronda anterior. Se llevó a cabo una primera ronda de PMSA de 24 horas con sustratos basados en rec-PrP de corzo y de uapití, sin semilla. Para la ronda siguiente, se añadió volumen líquido procedente de la primera ronda a un sustrato fresco (proporción 1:10). El resultado de ambas rondas se valoró por digestión con PK, electroforesis y tinción de proteína total, observándose rec-PrPres en todas las réplicas técnicas de la primera ronda, con una mayor intensidad de señal tras la segunda. **b)** Malplegamiento espontáneo *in vitro* por PMSA mediante rondas seriadas basadas en la adición de sustrato fresco a las esferas de vidrio de la ronda anterior. Se llevó a cabo una primera ronda de PMSA de 24 horas con sustratos basados en rec-PrP de corzo y de uapití, sin semilla. Para la ronda siguiente, se mantuvieron las esferas de la ronda anterior y se les añadió sustrato fresco. El resultado de ambas rondas se valoró por digestión con PK, electroforesis y tinción de proteína total, observándose rec-PrPres en todas las réplicas técnicas de la primera ronda, perdiéndose sin embargo intensidad de señal tras la segunda.

2.- Caracterización bioquímica de las PrP recombinantes de corzo y uapití obtenidas por malplegamiento espontáneo *in vitro* y desarrollo de un panel para la discriminación de potenciales confórmeros diferentes

Una vez establecido un sistema eficiente para la obtención de rec-PrP de cévido malplegadas espontáneamente *in vitro*, la siguiente herramienta necesaria para el presente estudio consistió en el desarrollo de un panel de pruebas bioquímicas que permitieran distinguir y clasificar de forma rápida y sistemática los diferentes confórmeros obtenidos en función de sus características. Con el fin de identificar las pruebas idóneas para la elaboración de dicho panel, se escogieron cuatro confórmeros potencialmente diferentes de corzo y cuatro de uapití de entre aquellas rec-PrP sometidas a PMSA durante los procesos de prueba y selección de los parámetros óptimos para el malplegamiento espontáneo *in vitro* de PrP recombinantes de cévido. Estos ocho confórmeros se seleccionaron de acuerdo con un criterio de búsqueda de la máxima variabilidad posible, es decir, seleccionando aquellos

RESULTADOS

aparentemente diferentes entre sí a juzgar por el patrón de movilidad electroforética observado al evaluar la presencia de rec-PrP^{res}, o bien por haber sido obtenidos en procesos con parámetro distintos.

- **Estabilización y adsorción de los confórmeros potencialmente diferentes en esferas de zirconio-sílice**

Para garantizar la eficacia del panel de caracterización de confórmeros, estos han de ser comparables entre sí, principalmente en términos de concentración o cantidad de rec-PrP^{res} y en lo relativo a potenciales mezclas de confórmeros que podría contener un producto de PMSA tras la generación espontánea de rec-PrP^{res}. Tal y como se ha descrito previamente, todas las esferas, aun siendo de diferente tamaño, producen resultados más o menos eficientes en el evento de malplegamiento espontáneo de la rec-PrP de cérvido por PMSA, obteniéndose rec-PrP^{res} con un mismo patrón de movilidad electroforética, pero con diferentes intensidades, sugiriendo que únicamente existe una variabilidad en la concentración final de rec-PrP^{res} presente en la muestra. Estas concentraciones distintas de PrP malplegada podrían tener un efecto sobre las características bioquímicas aparentes de dichas preparaciones podría llevar a una clasificación errónea de dos confórmeros iguales debido a diferencias en el método de obtención. Además, la naturaleza probablemente estocástica del evento de malplegamiento espontáneo, junto con la gran eficiencia del sistema, podría resultar inicialmente en la formación de distintos confórmeros con capacidad autopropagativa en un mismo tubo. Aunque esta mezcla de confórmeros no fuese homogénea, habiendo uno mayoritario y otro u otros en menor proporción, la posibilidad de que estos cuenten con propiedades bioquímicas potencialmente diferentes imposibilitaría la clasificación fehaciente de las muestras estudiadas en función de las características propias de los confórmeros que las componen. A esto hay que añadir la posibilidad de que haya impurezas de vidrio presentes en el medio, lo que podría fomentar la emergencia de confórmeros *de novo* durante las pruebas de caracterización bioquímica.

No obstante, mientras que las esferas de vidrio han demostrado ser las mejores aliadas posibles del malplegamiento espontáneo de rec-PrP por PMSA, las esferas de zirconio-sílice lo son de la propagación de priones (Erana et al, 2019). Basándose en la capacidad de los priones adsorbidos a superficies de distintos materiales de retener sus propiedades infecciosas (Mori et al, 2016), recientemente se ha descrito la posibilidad de adaptar la PMSA para adsorber rec-PrP malplegadas de topillo rojo a esferas de zirconio-sílice, permitiendo el uso de estas como semillas en los experimentos de propagación (Erana et al, 2020). De esta manera, al aplicar el protocolo de adsorción en esferas de este material, no solo se evita la formación de confórmeros *de novo* mediados por el vidrio, sino que se asegura

RESULTADOS

una muestra más homogénea, permitiendo la estabilización del confórmero mayoritario presente en la superficie del nuevo material (Erana et al, 2022 – charla Gottingen).

Así, las rec-PrP de corzo y uapití malplegadas espontáneamente por PMSA se adhirieron a esferas de zirconio-sílice, dando lugar a las semillas recombinantes estabilizadas de corzo denominadas Cor-Dx-A, Cor-Dx-B, Cor-Dx-C y Cor-Dx-D y a las semillas recombinantes de uapití denominadas Uap-Dx-A, Uap-Dx-B, Uap-Dx-C, Uap-Dx-D, con las cuales se realizaron las pruebas de caracterización bioquímica (Figura 5a). La adsorción de estas semillas a las esferas de zirconio-sílice de 1 mm de diámetro se llevó a cabo mediante 3 rondas seriadas de PMSA, permitiendo la propagación de las rec-PrP^{res} obtenidas por malplegamiento espontáneo en sustrato con rec-PrP de secuencia homóloga y cofactor. Finalmente, llevó a cabo una cuarta ronda con una mayor cantidad de esferas de zirconio-sílice previamente incubadas con el producto de la tercera ronda de PMSA y una mayor proporción semilla-sustrato. Al utilizar estas esferas que ya contienen una gran cantidad de rec-PrP^{res} en una reacción con exceso de semilla respecto a la cantidad de sustrato, se reducen las potenciales diferencias de cantidad adsorbida durante la incubación previa, de modo que el objetivo de esta última ronda es la saturación de la superficie de las esferas de zirconio-sílice con rec-PrP^{res}.

El producto líquido resultante de esta ronda fue extraído y analizado mediante electroforesis y tinción de proteína total tras su digestión con PK. Como se puede observar en la figura 5a, las semillas mantuvieron los rasgos principales de sus patrones de movilidad electroforética durante el proceso de estabilización y adsorción en esferas de zirconio-sílice, con pequeños cambios apreciables. Cabe destacar cómo, en el caso de las cuatro semillas de corzo analizadas, se pueden distinguir claramente dos patrones electroforéticos, mientras que en el caso de las semillas de uapití todas ellas presentan el mismo patrón, el cual es idéntico a uno de los observados en las semillas de corzo. De este modo se ha designado como α al patrón electroforético predominante entre las semillas de corzo, observado en Cor-Dx-A, Cor-Dx-B y Cor-Dx-C, y como β al patrón electroforético presente en todas semillas de uapití y en una de las de corzo, Cor-Dx-D. El patrón electroforético α se caracteriza por tres bandas bien definidas, una de ~ 16 kDa, una de mayor intensidad que el resto de ~ 9 kDa y una tercera banda difusa de ~ 2 kDa. En cambio, el patrón electroforético β cuenta con cinco bandas diferentes, dos muy intensas, una de ~ 16 kDa y de masa molecular ligeramente superior, dos de menor intensidad que se sitúan ligeramente por encima y por debajo de los 9 kDa, respectivamente, y una quinta banda difusa de ~ 2 kDa (Figura 5b). Las bandas descritas se corresponden a diferentes fragmentos proteolíticos de la rec-PrP^{res} generados tras la digestión con PK.

RESULTADOS

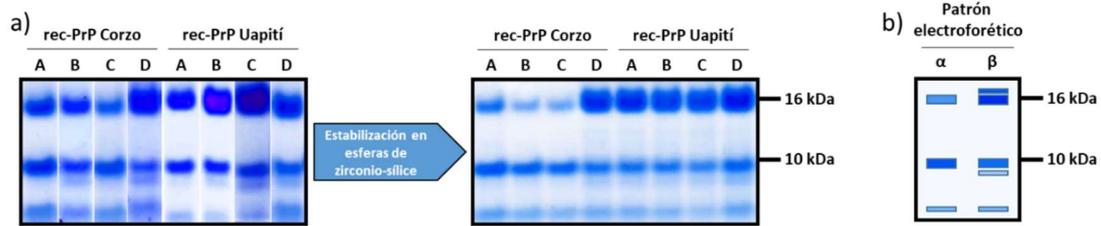


Figura 5. Estabilización de rec-PrP^{res} de corzo y uapití obtenidas por malplegamiento espontáneo *in vitro* en esferas de zirconio-sílice. a) Electroforesis y tinción de proteína total de cuatro rec-PrP^{res} de corzo y cuatro rec-PrP^{res} de uapití obtenidas por malplegamiento espontáneo *in vitro* antes y después del proceso de estabilización en esferas de zirconio-sílice. Las ocho rec-PrP^{res} se seleccionaron en función de su patrón electroforético y de la metodología con la que fueron obtenidos, buscando la máxima variabilidad posible. La estabilización a esferas de zirconio-sílice se llevó a cabo mediante 3 rondas seriadas de PMSA de 24 horas cada una utilizando sustrato basado en la rec-PrP de corzo o de uapití, dependiendo de la secuencia aminoacídica de las rec-PrP^{res}. Se llevó a cabo una cuarta ronda de PMSA para asegurar la adsorción de la rec-PrP^{res} a la superficie de las esferas de zirconio-sílice y la saturación de esta. Esto se logró mediante la incubación previa de las esferas añadidas a esta ronda con el producto de la ronda anterior durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación, y mediante una mayor proporción semilla:sustrato (1:4). b) Representación gráfica de los diferentes patrones de movilidad electroforética observados tras la estabilización en esferas de zirconio-sílice de las rec-PrP^{res} de corzo y uapití obtenidas por malplegamiento espontáneo *in vitro*. Pudieron diferenciarse dos patrones electroforéticos entre las ocho rec-PrP^{res} estabilizadas. El patrón electroforético α , observado en las semillas A, B y C de la rec-PrP de corzo, se caracteriza por una banda de ~ 16 kDa, otra de ~ 9 kDa y una tercera de ~ 2 kDa. El patrón β , observado en la semilla B de la rec-PrP de corzo y en las cuatro semillas de la rec-PrP de uapití, cuenta con 5 bandas en total, dos de ~ 16 kDa, dos de ~ 9 kDa y una de

Las esferas de zirconio-sílice correspondientes a cada semilla fueron recuperadas y lavadas para eliminar cualquier resto de rec-PrP^{res} no adsorbida a su superficie. Con el objetivo de comprobar que la rec-PrP^{res} observada en el producto líquido del pase coincidía con la adsorbida a la superficie de las esferas, se llevó a cabo una ronda adicional de PMSA. Para esta ronda se incluyeron cuatro réplicas técnicas para cada rec-PrP^{res}, consistentes estas en sustrato con rec-PrP de secuencia homóloga, cofactor, una esfera de zirconio-sílice de 2,3 mm de diámetro para favorecer la propagación y, como semilla, una de las esferas de zirconio-sílice de 1 mm de diámetro con rec-PrP^{res} adsorbida a su superficie. Tras analizar el resultado de este pase, se detectó rec-PrP^{res} en todas las réplicas técnicas, manteniendo el patrón electroforético característico de cada semilla y confirmando la capacidad de propagación de las esferas de zirconio-sílice con rec-PrP^{res} adsorbida su superficie.

Una vez obtenidas las semillas a analizar en un formato que permitía la comparación y caracterización de sus propiedades bioquímicas, se procedió a su análisis.

- **Ensayo de resistencia a PK**

RESULTADOS

La resistencia parcial a la digestión con PK no solo es una de las propiedades bioquímicas características de los priones *bona fide*, sino que además estos presentan distintos grados de resistencia dependiendo del tipo de cepa priónica de la que se trate (Kocisko et al, 1994; referencia de diferenciación de cepas por PK). De este modo, una digestión con concentraciones crecientes de PK permitiría distinguir las semillas recombinantes de corzo y uapití entre sí a la vez que demostraría que poseen esta característica propia de los priones *bona fide*. Así, las ocho semillas fueron sometidas a digestiones de PK con concentraciones crecientes de proteasa (25, 500, 1000, 2000, 3000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) analizando el resultado por electroforesis y tinción de proteína total (Figura 6).

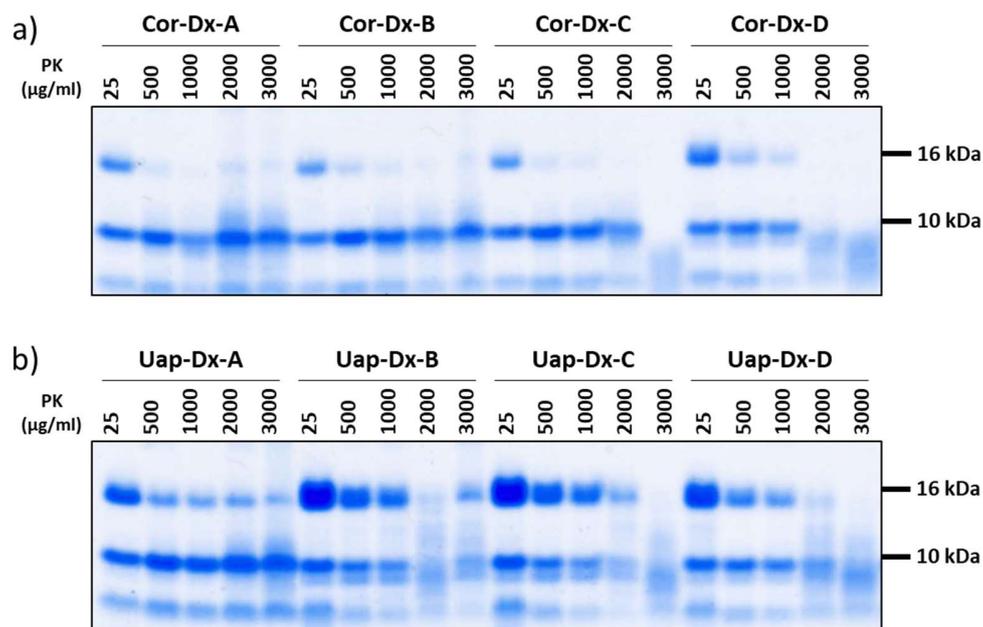


Figura 6. Evaluación de la resistencia a la digestión con PK de las rec-PrP^{res} de corzo y uapití obtenidas por malplegamiento espontáneo *in vitro*. a) Electroforesis y tinción de proteína total del producto de la digestión de las rec-PrPres de corzo con cantidades crecientes de PK. Cada una de las rec-PrPres seleccionadas se digirió en las mismas condiciones con 25, 500, 1000, 2000 o 3000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PK. En el caso de Cor-Dx-A, Cor-Dx-B y Cor-Dx-C, la banda de ~ 16 kDa va perdiendo intensidad cuando se digiere con concentraciones crecientes de PK. Cor-Dx-D mantiene su patrón electroforético intacto hasta ser digerida con una concentración de PK de 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, con concentraciones mayores es completamente degradada. b) Electroforesis y tinción de proteína total del producto de la digestión de las rec-PrPres de uapití con cantidades crecientes de PK. Cada una de las rec-PrPres seleccionadas se digirió en las mismas condiciones con 25, 500, 1000, 2000 o 3000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PK. Todas presentan gran resistencia a la digestión con PK, conservando su perfil de movilidad electroforética inalterada incluso tras la digestión con 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PK.

De esta forma, se observó cómo en las semillas de corzo Cor-Dx-A, Cor-Dx-B y Cor-Dx-C, caracterizadas por el patrón electroforético α , la banda de ~ 16 kDa es degradada a concentraciones de PK relativamente bajas, mientras que la banda de ~ 9 kDa se mantiene intacta tras la digestión con altas

RESULTADOS

concentraciones de proteasa. En el caso de la semilla de corzo Cor-Dx-D, el resultado de nuevo fue comparable al de las semillas de uapití. En estas cinco semillas caracterizadas por el patrón electroforético β se observó que todas las bandas se mantenían incluso tras la digestión con altas concentraciones de PK, con una pérdida en la intensidad de estas proporcional a la concentración de proteinasa. En el caso de las semillas Cor-Dx-D y Uap-Dx-D se intuye una menor resistencia a PK que en el resto con patrón β , aunque una diferencia tan sutil podría también deberse a variabilidad propia de la técnica habitual a altas concentraciones de PK. En cualquier caso, los resultados no sugieren la presencia de confórmers distintos entre aquellas que comparten patrón de movilidad, aunque confirman que los que presentan un patrón de tipo α son claramente distintos a los del tipo β .

- **Inmunodetección diferencial de fragmentos proteolíticos de rec-PrP^{res}**

Entre las técnicas bioquímicas utilizadas para caracterizar las nuevas cepas de caquexia crónica de cérvidos descritas en Europa destaca la inmunodetección diferencial utilizando anticuerpos monoclonales que reconocen epítomos circundantes al residuo 95 de la PrP (Tranulis et al, 2021). Esto se debe a que en esta región de la proteína se halla uno de los puntos de corte principales de la proteinasa K, el que, en el caso de las rec-PrP, da lugar al fragmento de ~ 16 kDa. De esta manera, en función de la configuración propia de cada confórmer, esta región se hallará estructurada de una forma u otra, provocando que el corte producido por la PK pueda ser más o menos N-terminal.

Con estos antecedentes, las ocho semillas recombinantes de cérvido se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se incubaron con dos anticuerpos monoclonales (Figura 7a). Los anticuerpos seleccionados fueron 12B2, que reconoce el epítopo WGQGG (aminoácidos en las posiciones 93 a 97 de la PrP de cérvido) y permitiría la caracterización de diferentes confórmers entre las semillas testadas, si mostraran diferencias en el punto de corte del extremo N-terminal y BAR224, que reconoce el epítopo FGNDYEDRYR (aminoácidos en las posiciones 144 a 154 de la PrP de cérvido) y debería detectar al menos la banda de ~ 16 kDa en todas las semillas analizadas (Figura 7b). Tal y como era de esperar, todas las semillas recombinantes fueron detectadas al ser incubadas con el anticuerpo BAR224. Sin embargo, el anticuerpo 12B2 únicamente detectó las semillas recombinantes caracterizadas por el patrón electroforético β , es decir, la semilla de corzo Cor-Dx-D y las cuatro semillas de uapití. Con las semillas recombinantes caracterizadas por el patrón electroforético α ocurre lo contrario: ninguna es detectada por el anticuerpo 12B2 (Figura 7a), por lo que el uso de este anticuerpo capaz de discriminar entre confórmers podría ser un método rápido y eficaz para la clasificación de cepas potencialmente diferentes.

RESULTADOS

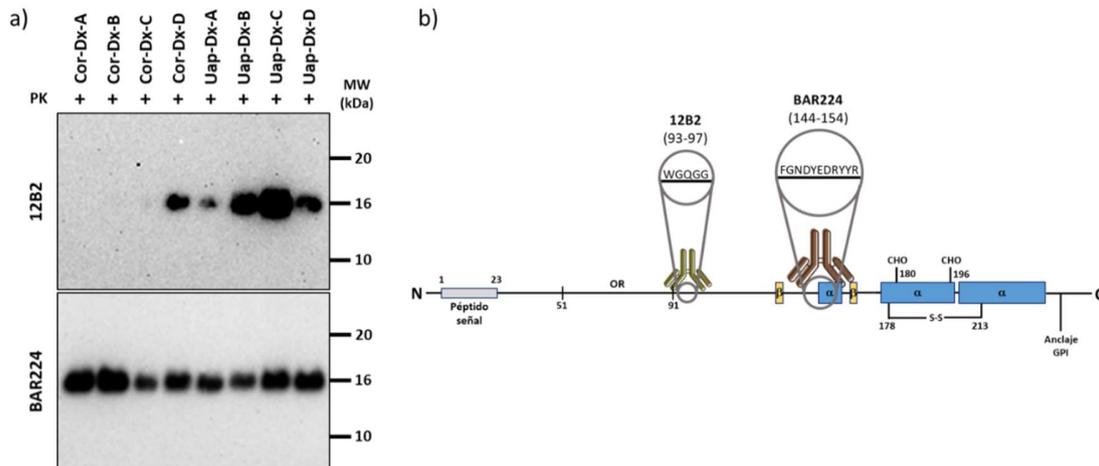


Figura 7. Inmunodetección diferencial de fragmentos proteolíticos de rec-PrP^{res}. a) *Western blot* revelado con los anticuerpos monoclonales 12B2 y BAR224 de las semillas recombinantes de corzo y uapití tras su digestión con PK. Mientras que el revelado con BAR224 permite la detección de todas las semillas recombinantes analizadas, el revelado de 12B2 únicamente permite la detección de cinco de las ocho semillas recombinantes. MW: marcador de masa molecular. b) Representación gráfica de una PrP, indicando los epítomos reconocidos por los anticuerpos 12B2 y BAR224. El número de residuo de cada epítomo se corresponde con la numeración de la PrP de corzo.

- **Capacidad de propagación en sustratos basados en PrP recombinantes de diferentes especies por PMSA**

Finalmente, dado que el rango de hospedadores susceptibles es también una propiedad diferencial de diversas cepas (ref. CWD en hasmter y ferret), se analizó por PMSA la capacidad de cada una de las semillas recombinantes de cérvido para propagar en sustratos constituidos por rec-PrP de diferentes especies. Las especies seleccionadas fueron aquellas cuya susceptibilidad a la caquexia crónica se conoce a través de la transmisión experimental de la enfermedad y que, por tanto, podrían ser también susceptibles a la propagación de semillas recombinantes de cérvido *in vitro*, a saber, hurón (Bartz et al, 1998), mapache (Hamir et al, 2003), vaca (Hamir et al, 2005; Hamir et al, 2006), mono ardilla (Marsh et al, 2005), oveja (Hamir et al, 2006), hámster sirio dorado (Raymond et al, 2007), visón (Harrington et al, 2008), ratón de patas blancas, ratón ciervo, topillo de la pradera, topillo de lomo rojo (Heisey et al, 2010), gato (Mathiason et al, 2013), cerdo (Moore et al, 2017) y castor (Herbst et al, 2022). En el caso de la oveja se han descrito diferentes susceptibilidades a la CWD en función del genotipo de la PrP ovina, por lo que,

RESULTADOS

los tres genotipos más frecuentes (ARQ, VRQ y ARR), también se han incluido en este estudio. A pesar de contar con un total de 14 especies diferentes para este estudio, las proteínas priónicas seleccionadas son relativamente similares entre sí, albergando únicamente 48 residuos con variaciones entre estas y la PrP de corzo tras considerar únicamente desde el residuo 90 hasta el 234, la región más crítica a la hora de determinar la capacidad de malplegamiento (Figura 8).

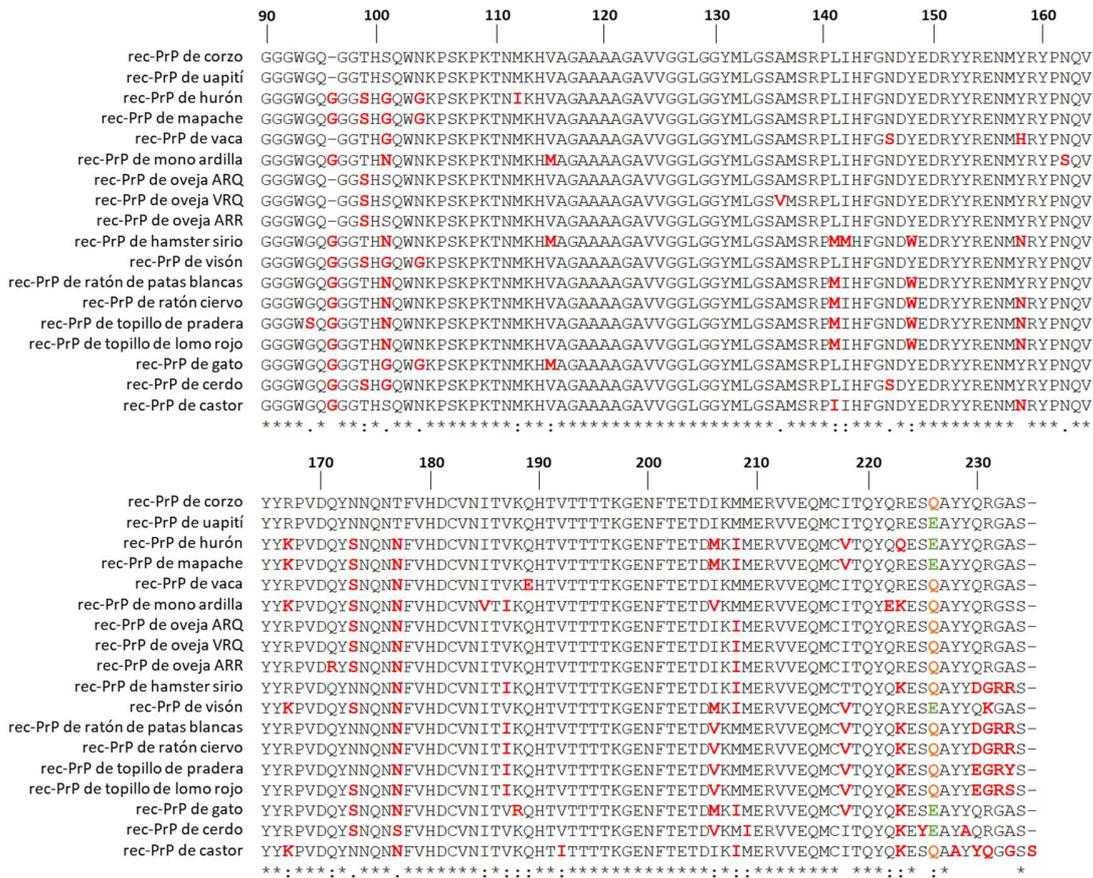


Figura 8. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas comprendidas entre los residuos 90 y 234 de las rec-PrP de corzo y uapití con las de las rec-PrP de las especies susceptibles a la infección con caquexia crónica. En la sección de las rec-PrP analizada, la más crítica a la hora de evaluar el malplegamiento, se han detectado 48 posiciones en las que aparecen cambios con respecto a las secuencias aminoacídicas de corzo y uapití. Se han marcado en rojo todos los aminoácidos de las rec-PrP de estas especies en los que se observa variabilidad con respecto a las secuencias de corzo y uapití. En el residuo 226, se ha marcado en naranja la presencia de glutamina y en verde la de glutamato. Sobre las secuencias se muestra el número de los residuos, desde la posición 90 a la 234 de las rec-PrP. Bajo las secuencias se representa el grado de homología en cada residuo: un asterisco (*) representa una homología del 100%; dos puntos (:) representan un cambio conservativo; un punto (.) representa un cambio poco conservativo.; un espacio representa una homología nula.

En esta ocasión, para la obtención de las rec-PrP de las especies listadas, además de a la extracción de DNA genómico a partir de tejidos, se recurrió a la síntesis génica del ORF de algunas de ellas (ver

RESULTADOS

detalles de obtención de la rec-PrP de cada especie en Materiales y Métodos), seguida de su subclonación en el mismo vector de expresión que los de corzo y uapití, tras lo cual se procedió a su transformación en bacterias competentes, a la inducción de la producción de la proteína de interés y a su posterior purificación.

Tras la obtención de la rec-PrP de las diferentes especies indicadas, la capacidad de propagación de las semillas recombinantes de corzo y uapití en ellas se evaluó mediante una ronda de PMSA de 24 horas y análisis por electroforesis y tinción de proteína total de la rec-PrP^{res} resultante. Para ello se prepararon dos réplicas técnicas para cada combinación posible de semilla recombinante y sustrato, utilizando una esfera de zirconio-sílice de 2,3 mm de diámetro y tres esferas de zirconio-sílice de 1 mm de diámetro con rec-PrP^{res} adsorbida a su superficie en cada reacción. Tras digerir el resultado de esta ronda de PMSA con PK, el análisis por electroforesis y tinción de proteína total mostró una propagación eficiente de todas las semillas recombinantes de corzo y uapití en la mayoría de las rec-PrP de las especies testadas: hurón, mapache, vaca, mono ardilla, oveja con genotipo VRQ, visón, ratón de patas blancas, ratón ciervo, topillo de la pradera, topillo de lomo rojo y castor. Por el contrario, estas mismas semillas mostraron una ausencia total de propagación en sustratos constituidos por las rec-PrP de oveja con genotipo ARR, hámster sirio dorado, gato y cerdo; y una propagación variable con la rec-PrP de la oveja con genotipo ARQ. Mientras que, con algunas semillas recombinantes, como Cor-Dx-A, Cor-Dx-B y Cor-Dx-C, se observaba una propagación eficiente en todas las réplicas añadidas, otras como Cor-Dx-D, Uap-Dx-A, Uap-Dx-C y Uap-Dx-D, mostraron una propagación ineficiente, observándose una señal muy leve de rec-PrP^{res}, sugiriendo la existencia de una barrera de transmisión incompleta. Además, la semilla Uap-Dx-B, fue completamente incapaz de propagar en sustrato basado en la rec-PrP de oveja ARQ, mostrando una barrera de transmisión completa.

Ante la aparente capacidad de la prueba de propagación de semillas recombinantes de corzo y uapití en el sustrato basado en rec-PrP de oveja con genotipo ARQ de diferenciar confórmers de cérvido, se llevó a cabo una repetición de este experimento en condiciones más restrictivas con el fin de poder distinguir sin lugar a duda aquellas semillas capaces de propagar en este sustrato de aquellas que presentaban una dificultad o incapacidad de hacerlo. En esta ocasión se realizó una PMSA de 6 horas en lugar de 24 h, con dos réplicas técnicas para cada semilla analizada, con una esfera de zirconio-sílice de 2,3 mm de diámetro y solamente una esfera de zirconio-sílice de 1 mm de diámetro con rec-PrP^{res} adsorbida a su superficie, reduciendo así la cantidad de semilla. Para asegurar la capacidad de propagación de las semillas recombinantes en estas condiciones, se incluyeron como controles sustratos con PrP

RESULTADOS

recombinante de secuencia homóloga a cada semilla. El producto de esta ronda de PMSA se digirió con PK y se analizó por electroforesis y tinción de proteína total, obteniéndose resultados más concluyentes que los anteriormente observados en términos de barrera de transmisión (Figura 9). En esta ocasión se pudo observar cómo únicamente las semillas de corzo Cor-Dx-A, Cor-Dx-B y Cor-Dx-C pudieron propagar en el sustrato basado en la rec-PrP de oveja con genotipo ARQ, mientras que el resto de las semillas fueron incapaces. Cabe mencionar que en la figura 9a se puede observar una leve señal en el análisis de una de las réplicas técnicas de la semilla Uap-Dx-A. Sin embargo, dado que únicamente se puede apreciar esta señal en una de las dos réplicas técnicas y su intensidad es sumamente débil en comparación con las obtenidas por las semillas de corzo antes indicadas, la conclusión de la existencia de una barrera de transmisión fuerte, si no completa, llevaría a su clasificación como semilla sin capacidad de propagación en rec-PrP de oveja con genotipo ARQ. De este modo, se considera que existe una barrera de transmisión que impide o, al menos, dificulta en gran medida la propagación en este sustrato y que dicha barrera afecta a las semillas Cor-Dx-D, Uap-Dx-A, Uap-Dx-B, Uap-Dx-C y Uap-Dx-D, caracterizadas por un patrón electroforético β , mientras que las semillas recombinantes de corzo Cor-Dx-A, Cor-Dx-B y Cor-Dx-C, caracterizadas por el patrón electroforético α , no se ven afectadas por ella (Figura 9b).

RESULTADOS

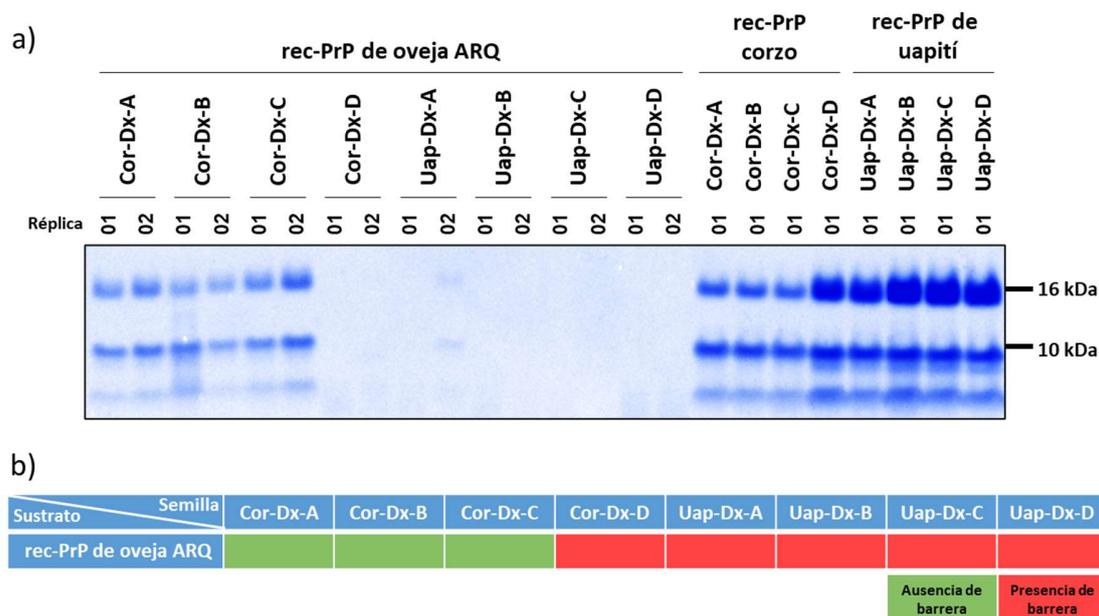


Figura 9. Propagación de semillas recombinantes de corzo y uapití en sustrato basado en rec-PrP de oveja con genotipo ARQ mediante PMSA con condiciones restrictivas. a) Electroforesis y tinción de proteína total del producto de la propagación de las semillas recombinantes de corzo y uapití en sustrato con rec-PrP de oveja ARQ tras una ronda de PMSA de 6 horas de duración. Como semilla se utilizó una única esfera con rec-PrP^{res} adsorbida a su superficie por cada réplica técnica. Para comprobar la capacidad de las semillas utilizadas de propagar en condiciones restrictivas, se llevó a cabo una ronda de PMSA con idénticos parámetros en la que se propagó cada semilla en el sustrato en el que fue generada. Se puede observar cómo únicamente las semillas recombinantes Cor-Dx-A, Cor-Dx-B y Cor-Dx-C fueron capaces de propagar en sustrato con rec-PrP de oveja ARQ, mientras que todas las semillas de corzo y uapití propagaron en los sustratos con rec-PrP homóloga. **b)** Representación de la ausencia o presencia de barrera de transmisión *in vitro* entre las semillas recombinantes de corzo y uapití y sustrato con rec-PrP de oveja ARQ. Se han marcado en verde aquellas semillas recombinantes para las que se ha demostrado una ausencia de barrera de transmisión *in vitro* con respecto a la oveja ARQ, es decir, aquellas que han mostrado propagación en sustrato con rec-PrP de esta especie mediante PMSA con condiciones restrictivas. En rojo se representan las semillas que presentan una barrera de transmisión *in vitro* con respecto a la oveja ARQ, es decir, aquellas que no han mostrado propagación mediante PMSA en condiciones restrictivas.

- **Definición del panel para la caracterización bioquímica de las semillas recombinantes de corzo y uapití**

A partir de las pruebas descritas anteriormente se generó un panel que permite la caracterización de las semillas recombinantes de corzo y uapití en función de sus propiedades bioquímicas que será utilizado para el análisis del resto de semillas recombinantes de cérvido que se muestran a lo largo del estudio. Para la elaboración de este panel se seleccionaron los siguientes criterios derivados de las pruebas previamente detalladas:

RESULTADOS

- Patrón electroforético de la rec-PrP^{res} obtenido mediante digestión con PK y análisis por electroforesis y tinción de proteína total tras la estabilización y adsorción de la semilla recombinante a la superficie de esferas de zirconio-sílice.
- Capacidad de propagación de las semillas recombinantes en un sustrato basado en rec-PrP de oveja con genotipo ARQ por PMSA en condiciones restrictivas, considerando esta capacidad o incapacidad de propagación como ausencia o presencia de barrera de transmisión, respectivamente.
- Inmunodetección positiva o negativa con el anticuerpo 12B2, que reconoce el epítipo WGQGG (aminoácidos en las posiciones 93 a 97 de la PrP de cévido).

Cabe mencionar que aquellas pruebas que no permitieron diferenciar entre las semillas recombinantes de corzo y uapití analizadas no fueron añadidas al panel de caracterización bioquímica. Tampoco se incluyó el ensayo de resistencia a PK debido a las dificultades técnicas asociadas al propio ensayo, así como a la poca información que aporta en la diferenciación como tal.

Así, de acuerdo con los criterios incluidos en el panel de caracterización, las distintas semillas recombinantes de cévido se agruparon acorde a sus potenciales características de cepa, si bien no serán consideradas como cepas priónicas hasta no que no se confirme su infectividad y se determinen sus distintivas propiedades biológicas en modelos animales. Por eso, el resultado de la caracterización propuesta permitiría una clasificación de los distintos confórmeros en función de sus propiedades bioquímicas, demostrando su potencial de comportarse como cepas priónicas distinguibles una vez inoculados en modelos animales. De este modo, los grupos resultantes de la caracterización bioquímica se denominaron como “cepas potenciales”, tratándose como tal.

Las semillas recombinantes de corzo y uapití utilizadas para la elaboración del panel de caracterización bioquímica se clasificaron de esta manera en dos grupos o cepas potenciales, la $\alpha 0(-)$ y la $\beta 1(+)$. El código utilizado para la denominación de las cepas potenciales consta de tres caracteres (una letra del alfabeto griego, un número y un signo matemático entre paréntesis), cada uno de ellos haciendo alusión a uno de los criterios contemplados. La letra del alfabeto griego se asigna en función del patrón electroforético presentado por la semilla recombinante a caracterizar, tal y como se ha descrito previamente. El número puede tomar el valor 0 o 1, dependiendo de la ausencia o presencia de barrera de transmisión a oveja con genotipo ARQ, respectivamente. Por último, el signo matemático entre paréntesis puede ser un signo positivo, (+), o negativo, (-), y hace referencia a la capacidad de la semilla

RESULTADOS

de ser detectada o no, respectivamente, por el anticuerpo 12B2. Así, las tres semillas de Cor-Dx-A, Cor-Dx-B y Cor-Dx-C se clasificaron como la cepa potencial $\alpha 0(-)$ al presentar un patrón electroforético α , propagar en un sustrato basado en rec-PrP de oveja con genotipo ARQ por PMSA en condiciones restrictivas (ausencia de barrera de transmisión) y no ser detectadas por el anticuerpo monoclonal 12B2. Por otro lado, la semilla recombinante de corzo Cor-Dx-D y las semillas recombinantes de uapití Uap-Dx-A, Uap-Dx-B, Uap-Dx-C y Uap-Dx-D se clasificaron como la cepa potencial $\beta 1(+)$ por presentar un patrón electroforético β , no ser capaces de propagar en un sustrato basado en rec-PrP de oveja con genotipo ARQ por PMSA en condiciones restrictivas (presencia de barrera de transmisión) y poder ser detectadas por el anticuerpo monoclonal 12B2 (Tabla 1).

3.- Impacto del cofactor en el malplegamiento espontáneo y propagación *in vitro* de las PrP recombinantes de corzo y uapití

Partiendo del conocimiento previo acerca del comportamiento del dextrano sulfatado como cofactor en la PMSA, favoreciendo el proceso de malplegamiento *in vitro*, sea espontáneo o mediado por semilla, este estuvo presente en todos los experimentos descritos anteriormente. Sin embargo, la adición de este cofactor no es estrictamente necesaria para que el evento de malplegamiento de PrP recombinantes *in vitro* tenga lugar ((400), (383); Perez-Castro et al, 2021 – charla Jaca). De este modo,

Tabla 1. Caracterización bioquímica *in vitro* de las semillas recombinantes de corzo y uapití.

Confórmero seleccionado	Patrón electroforético	Barrera de transmisión a oveja ARQ	Detección con 12B2	Potencial cepa
Cor-Dx-A	α	Ausencia	No	$\alpha 0(-)$
Cor-Dx-B	α	Ausencia	No	$\alpha 0(-)$
Cor-Dx-C	α	Ausencia	No	$\alpha 0(-)$
Cor-Dx-D	β	Presencia	Sí	$\beta 1(+)$
Uap-Dx-A	β	Presencia	Sí	$\beta 1(+)$
Uap-Dx-B	β	Presencia	Sí	$\beta 1(+)$
Uap-Dx-C	β	Presencia	Sí	$\beta 1(+)$
Uap-Dx-D	β	Presencia	Sí	$\beta 1(+)$

Cada confórmero se clasificó como una potencial cepa en función de las propiedades bioquímicas evaluadas mediante el panel de caracterización. El nombre de cada potencial cepa se compone de tres caracteres que resumen las siguientes propiedades de cada confórmero:

- La letra del alfabeto griego representa el patrón electroforético presentado por el confórmero.
- Los valores numéricos 0 o 1 hacen referencia a la ausencia o presencia de barrera de transmisión a oveja ARQ, respectivamente.
- El signo positivo, (+), o negativo, (-), se correlaciona con la capacidad del confórmero de ser detectado o no, respectivamente, por el anticuerpo 12B2.

En los ocho confórmeros analizados se han diferenciado dos potenciales cepas: $\alpha 0(-)$ y $\beta 1(+)$.

tras haber comprobado la eficacia del sistema de malplegamiento espontáneo por PMSA de las rec-PrP de corzo y uapití y haber establecido una caracterización de los confórmeros obtenidos, todo ello en

RESULTADOS

presencia de dextrano sulfatado, se analizó el efecto de la ausencia de este en el malplegamiento espontáneo y en las propiedades bioquímicas de las semillas recombinantes ya caracterizadas.

Así, se diseñaron dos líneas experimentales. La primera, esquematizada en la figura 10a, se centraría en adaptar las semillas recombinantes generadas en presencia de dextrano sulfatado por malplegamiento espontáneo *in vitro* a un medio sin cofactor mediante su propagación por PMSA. El objetivo era determinar el papel del cofactor en las características de los confórmers generados previamente. Las nuevas semillas adaptadas, designadas por su anterior denominación precedida del prefijo CB-, indicativo de su adaptación a un sustrato consistente únicamente en la rec-PrP y la solución de conversión (CB, del inglés, *conversion buffer*), se someterían al panel de caracterización bioquímica ya descrito, con la sola diferencia de que la prueba de propagación en sustrato basado en rec-PrP de oveja con genotipo ARQ se haría también en ausencia de cofactor. Tras esta caracterización, se llevaría a cabo el proceso contrario, en el que las semillas adaptadas a un medio sin cofactor se readaptarían tras una propagación por PMSA sobre un medio con dextrano sulfatado. De nuevo, las semillas readaptadas, cuyo nombre aparece precedido esta vez por el prefijo Dx- (dextrano sulfatado), se clasificarían siguiendo el panel de caracterización bioquímica. Con ello, se buscó evaluar las potenciales alteraciones que podrían sufrir los confórmers obtenidos en presencia de dextrano al ser propagadas en un medio sin cofactor y, a su vez, ver si estas potenciales diferencias eran o no irreversibles. La segunda línea experimental, esquematizada en la figura 10b, consistió básicamente en el proceso inverso al explicado. De esta manera, se generaron semillas recombinantes de corzo y uapití *de novo* mediante malplegamiento espontáneo por PMSA en ausencia de cofactor y se sometieron a procesos de adaptación a un medio con dextrano y posterior readaptación a un medio libre del mismo, llevándose a cabo la caracterización bioquímica de los confórmers producidos en cada punto del procedimiento. De nuevo, el objetivo fue evaluar el efecto del

RESULTADOS

cofactor o la ausencia de este en el malplegamiento espontáneo y cómo estas diferencias influían en las propiedades de las rec-PrP^{res} resultantes.

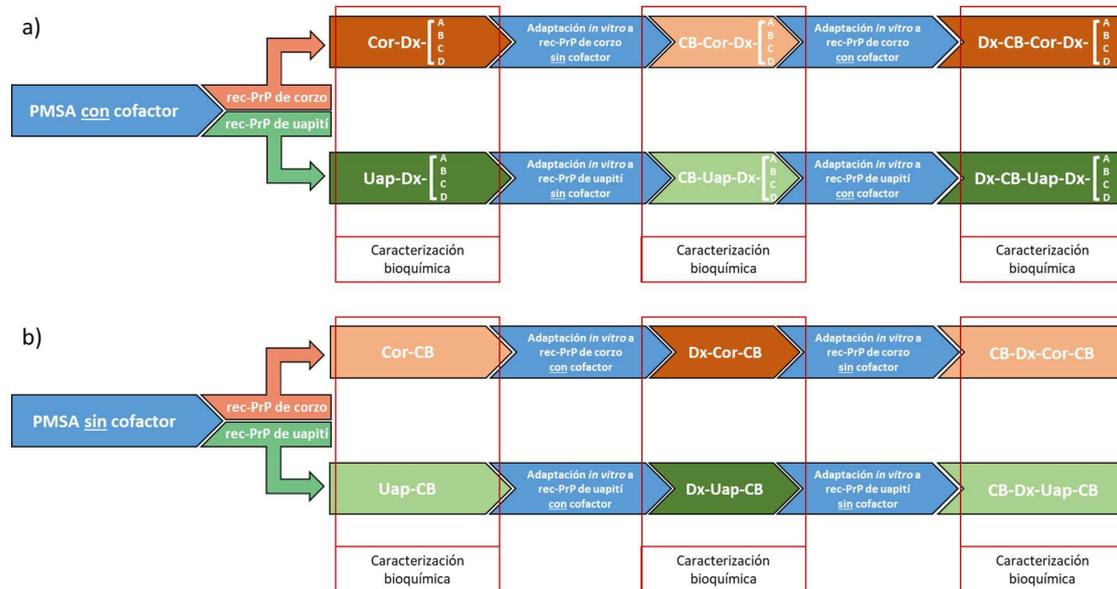


Figura 10. Flujo de trabajo esquemático del estudio del efecto del cofactor en el malplegamiento espontáneo y propagación *in vitro* de las PrP recombinantes de corzo y uapití. a) Adaptación de las semillas recombinantes de corzo y uapití obtenidas mediante malplegamiento espontáneo *in vitro* en presencia de cofactor a un medio sin dextrano sulfatado y readaptación al medio de origen, con caracterización bioquímica de los confórmeros obtenidos. **b)** Adaptación de las semillas recombinantes de corzo y uapití obtenidas mediante malplegamiento espontáneo *in vitro* en ausencia de cofactor a un medio con dextrano sulfatado y readaptación al medio de origen, con caracterización bioquímica de los confórmeros obtenidos.

- **Estudio del papel del cofactor en el malplegamiento *in vitro* de rec-PrP de corzo y uapití partiendo de semillas generadas con dextrano sulfatado**

La adaptación a un medio sin cofactor de las semillas recombinantes de corzo y uapití obtenidas por malplegamiento espontáneo en presencia de dextrano sulfatado se llevó a cabo mediante tres rondas seriadas de PMSA. La primera ronda se hizo utilizando como semilla tres esferas de zirconio-sílice de 1 mm con rec-PrP^{res} adsorbida a su superficie, añadiéndolas a un sustrato basado en la rec-PrP de secuencia homóloga a la de la semilla y CB, sin cofactor, con la adición de una esfera de zirconio-sílice de 2,3 mm de diámetro. Con base en la tendencia ya descrita de la rec-PrP a adsorberse en superficies, se tomó la esfera de zirconio-sílice de 2,3 mm de diámetro tras esta primera ronda y se lavó con H₂O estéril. Gracias a este procedimiento, la rec-PrP^{res} generada en el sustrato en cada nueva ronda se adsorbería sobre la superficie de la nueva esfera añadida, mientras que la rec-PrP^{res} utilizada como semilla se mantendría prácticamente en su totalidad eficientemente adsorbida a las esferas de zirconio-sílice de 1 mm. Así, se llevó a cabo una

RESULTADOS

segunda ronda de PMSA en la que se utilizó como semilla la esfera de zirconio-sílice de 2,3 mm de diámetro recuperada del pase anterior, manteniendo el resto de las condiciones idénticas a las de la primera ronda. Estas dos rondas de PMSA tuvieron una duración de 6 horas cada una. Como el dextrano sulfatado es altamente soluble, los lavados a los que fueron sometidos las esferas utilizadas como semillas cumplieron también la función de eliminar cualquier traza de este cofactor que pudiera encontrarse adsorbida a ella. De este modo, el segundo pase de PMSA podía considerarse libre de cofactor y, la rec-PrP^{res} generada en él por propagación, adaptada a este medio. La tercera ronda de PMSA consistió en la adsorción a esferas de zirconio-sílice de 1 mm de diámetro de la rec-PrP^{res} adaptada a un medio sin cofactor obtenida tras los dos primeros pases, siguiendo el protocolo ya descrito consistente en la incubación de las esferas con el producto líquido del pase anterior seguido de una ronda de PMSA de 24 horas, de nuevo en sustrato libre de dextrano sulfatado. Finalmente, tras comprobar que las nuevas esferas con rec-PrP^{res} adsorbidas a ellas eran capaces de actuar como semilla en ensayos de propagación por PMSA y que el patrón electroforético obtenido era idéntico al del producto líquido del tercer pase de la adaptación, se procedió a llevar a cabo el proceso contrario. Este proceso consistió en la readaptación a un medio con dextrano sulfatado de las semillas de corzo y uapití previamente adaptadas a un medio sin cofactor y se desarrolló utilizando el procedimiento descrito anteriormente, con la única salvedad de la adición de dextrano sulfatado como cofactor en el sustrato.

El resultado de estas adaptaciones a medios sin y con cofactor se puede observar en la figura 11. En ella se aprecia cómo los dos patrones electroforéticos descritos, α y β , sufren modificaciones al adaptar las semillas que los presentan al medio sin dextrano sulfatado, no pudiéndose descartar un posible cambio en su conformación. Este cambio es congruente con las potenciales cepas descritas, de manera que las que mostraban el mismo patrón inicialmente seguían compartiendo patrón electroforético tras la modificación. Cabe destacar que, al volver adaptar estas semillas a un medio con dextrano sulfatado, los patrones electroforéticos se recuperaron, sugiriendo esto un retorno de la rec-PrP^{res} a su conformación de origen.

RESULTADOS

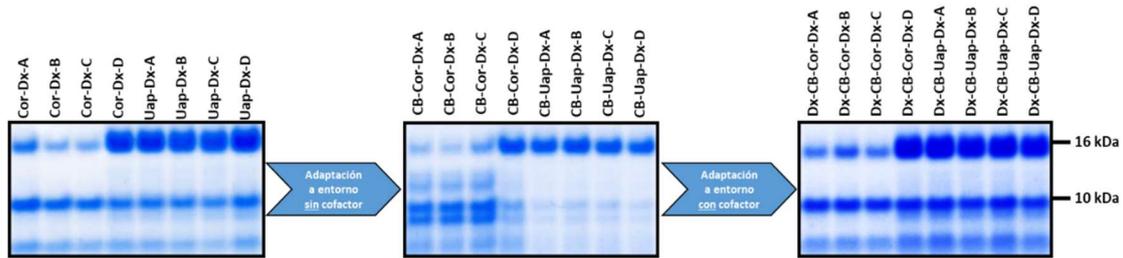


Figura 11. Adaptación y readaptación de las semillas recombinantes de corzo y uapití obtenidas por malplegamiento espontáneo *in vitro* en presencia de cofactor a un medio sin y con dextrano sulfatado, respectivamente. Los procesos de adaptación y readaptación se llevaron a cabo mediante dos rondas seriadas de PMSA de 6 horas cada una utilizando esferas de zirconio-sílice con rec-PrP^{res} adsorbidas a su superficie como semilla en sustratos sin o con dextrano sulfatado. Se llevó a cabo una tercera ronda de adsorción y saturación de los nuevos confórmers de rec-PrP^{res} a la superficie de esferas de zirconio-sílice. Las semillas recombinantes de corzo y uapití generadas en presencia de dextrano sulfatado sufrieron un cambio en sus patrones electroforéticos. Al ser readaptados los nuevos confórmers a un entorno con cofactor, estos recuperaron sus patrones electroforéticos originales.

- **Estudio del papel del cofactor en el malplegamiento *in vitro* de rec-PrP de corzo y uapití partiendo de semillas generadas sin dextrano sulfatado**

Una vez analizado el efecto de la ausencia del cofactor en la propagación de semillas recombinantes de corzo y uapití generadas tras el malplegamiento espontáneo por PMSA en presencia de dextrano sulfatado, el siguiente paso fue evaluar el efecto de esta ausencia en el malplegamiento espontáneo *in vitro per se*. Para ello se siguió el protocolo de rondas seriadas de PMSA sin semilla descrito en el primer apartado de la sección de resultados tanto con la rec-PrP de corzo como con la rec-PrP de uapití, e introduciendo como única diferencia la ausencia del cofactor. En ambos casos fueron cuatro las réplicas técnicas sometidas al proceso. De las cuatro réplicas técnicas con sustrato basado en la rec-PrP de corzo, todas mostraron malplegamiento espontáneo tras la primera ronda de PMSA al analizar la presencia de rec-PrP^{res} mediante electroforesis y tinción de proteína total, siendo las cuatro idénticas en su patrón electroforético. En el caso de las réplicas técnicas con sustrato basado en la rec-PrP de uapití, tres de ellas dieron señal de rec-PrP^{res} positiva tras la primera ronda de PMSA y la cuarta tras la segunda, también con patrones electroforéticos iguales en todas ellas.

Tras el éxito cosechado en la obtención mediante malplegamiento espontáneo por PMSA de cuatro confórmers recombinantes de corzo y cuatro de uapití en ausencia de cofactor, se procedió a la estabilización y adsorción de estos confórmers en esferas de zirconio-sílice siguiendo el protocolo ya descrito. Sin embargo, todos los confórmers mostraron una capacidad de propagación *in vitro* muy pobre cuando las esferas de vidrio eran sustituidas por las de zirconio-sílice, desapareciendo la señal de rec-PrP^{res} entre ronda y ronda de PMSA cuando se analizaba el producto de estas por electroforesis y tinción

RESULTADOS

de proteína total, claro indicativo de propagación ineficiente o nula. Finalmente fue posible estabilizar y adsorber en esferas de zirconio-sílice una de las semillas recombinantes de corzo y una de las semillas recombinantes de uapití de las cuatro obtenidas en cada caso, denominadas como Cor-CB y Uap-CB. Siguiendo el procedimiento indicado, estas semillas recombinantes se adaptaron a un medio con dextrano sulfatado y, tras la adsorción de las semillas Dx-Cor-CB y Dx-Uap-CB, obtenidas en este proceso, se llevó a cabo su readaptación a un medio sin cofactor.

En la figura 12 se puede observar cómo los patrones electroforéticos originales de las semillas recombinantes Cor-CB y Uap-CB cambian al adaptarse estas a un medio con cofactor y, posteriormente, se recuperan los patrones electroforéticos iniciales al volver a ser adaptadas las semillas resultantes, Dx-Cor-CB y Dx-Uap-CB, a un medio sin dextrano sulfatado, tal y como ocurría con las semillas de corzo y uapití malplegadas espontáneamente *in vitro* en presencia de cofactor en el experimento previo (Figura 11).

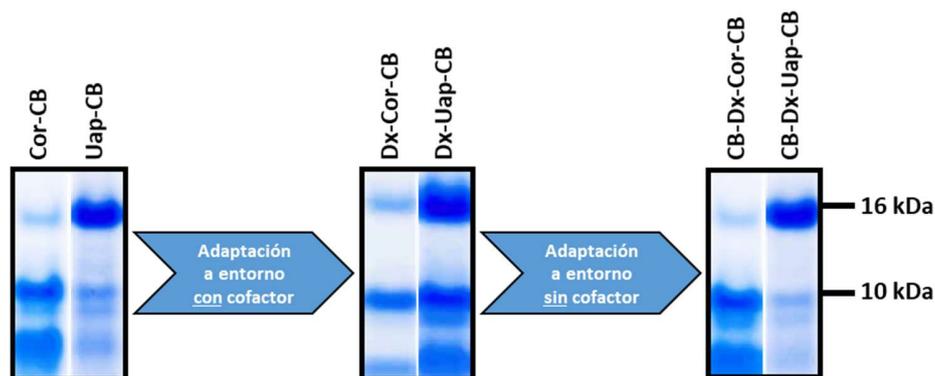


Figura 12. Adaptación y readaptación de las semillas recombinantes de corzo y uapití obtenidas por malplegamiento espontáneo *in vitro* en ausencia de cofactor a un medio con y sin dextrano sulfatado, respectivamente. Las semillas recombinantes de corzo y uapití se obtuvieron por malplegamiento espontáneo *in vitro* mediante PMSA de 24 horas en ausencia de cofactor y con esferas de vidrio, con posterior estabilización en esferas de zirconio-sílice. Los procesos de adaptación y readaptación se llevaron a cabo mediante dos rondas seriadas de PMSA de 6 horas cada una utilizando esferas de zirconio-sílice con rec-PrP^{res} adsorbidas a su superficie como semilla en sustratos con o sin dextrano sulfatado. Se llevó a cabo una tercera ronda de adsorción y saturación de los nuevos confórmers de rec-PrP^{res} a la superficie de esferas de zirconio-sílice. Las semillas recombinantes de corzo y uapití generadas en ausencia de dextrano sulfatado sufrieron una modificación en sus patrones electroforéticos al ser adaptadas a un medio con cofactor. Al ser readaptados los nuevos confórmers a un entorno con cofactor, estos recuperaron sus patrones electroforéticos originales.

- **Caracterización bioquímica de las semillas recombinantes de corzo y uapití obtenidas**

Tras haber obtenido una batería de semillas recombinantes de corzo y uapití que incluye a las proteínas malplegadas espontáneamente *in vitro* en presencia y ausencia de cofactor y a las variaciones

RESULTADOS

de estas derivadas de su adaptación a medios con y sin dextrano sulfatado, se procedió a la caracterización de las propiedades bioquímicas de todas ellas aplicando el panel de pruebas desarrollado para tal fin.

En la tabla 2 se recoge el resumen de esta caracterización, indicándose la cepa potencial correspondiente a cada confórmero evaluado. De nuevo, cada cepa potencial se denomina por un código compuesto por una letra del alfabeto griego, un valor numérico, 0 o 1, y un signo matemático entre paréntesis, (+) o (-), de manera que cada parte de este código hace referencia a cada uno de los criterios en los que se basa la caracterización. En lo respectivo al criterio basado en el patrón de movilidad electroforética, la figura 13a incluye la imagen de una semilla recombinante representativa de cada patrón diferente observado, mientras que la figura 13b muestra una representación gráfica de cada uno de estos patrones electroforéticos con la letra del alfabeto griego que se le asocia.

RESULTADOS

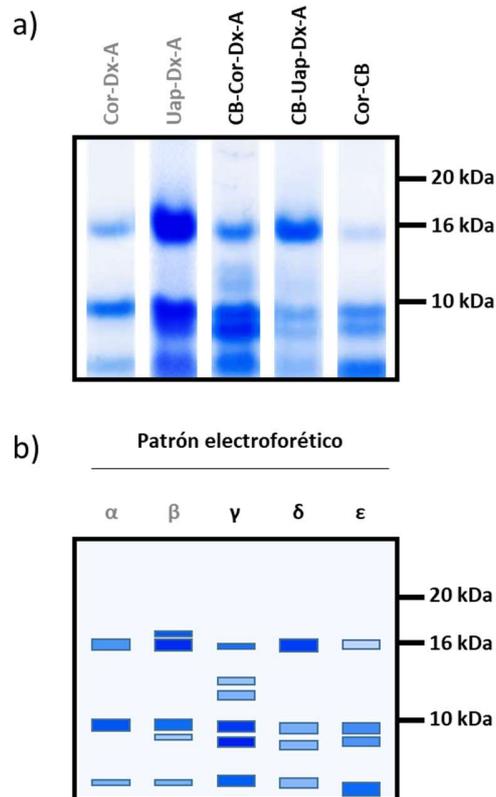


Figura 13. Patrones de movilidad electroforética observados en las semillas recombinantes obtenidas por malplegamiento *in vitro* de las rec-PrP de corzo y uapití en presencia y ausencia de dextrano sulfatado. a) Electroforesis y tinción de proteína total de una rec-PrP^{res} de cérvido representativa para cada patrón electroforético diferente observado. **b)** Representación gráfica de los diferentes patrones de movilidad electroforética observados entre las rec-PrP^{res} de cérvido analizadas. La representación gráfica de cada patrón electroforético se muestra bajo la imagen de electroforesis y tinción de proteína total de la rec-PrP^{res} de cérvido representativa de cada uno de estos patrones. Los nombres de confórmers y la letra griega de los patrones electroforéticos aparecen en gris cuando hacen referencia a los ya descritos en apartados anteriores.

RESULTADOS

Tabla 2. Caracterización bioquímica *in vitro* de las semillas recombinantes de corzo y uapití obtenidas en presencia y ausencia de cofactor y de los confórmeros generados tras su adaptación y readaptación a medios con y sin dextrano sulfatado.

Confórmero de origen	Potencial cepa	Adaptación	Confórmero adaptado	Cepa potencial	Readaptación	Confórmero readaptado	Potencial cepa
Cor-Dx-A	$\alpha 0(-)$	Dx → CB	CB-Cor-Dx-A	$\gamma 1(+)$	CB → Dx	Dx-CB-Cor-Dx-A	$\alpha 0(+)$
Cor-Dx-B	$\alpha 0(-)$		CB-Cor-Dx-B	$\gamma 1(+)$		Dx-CB-Cor-Dx-B	$\alpha 0(+)$
Cor-Dx-C	$\alpha 0(-)$		CB-Cor-Dx-C	$\gamma 1(+)$		Dx-CB-Cor-Dx-C	$\alpha 0(+)$
Cor-Dx-D	$\beta 1(+)$		CB-Cor-Dx-D	$\delta 1(-)$		Dx-CB-Cor-Dx-D	$\beta 0(+)$
Uap-Dx-A	$\beta 1(+)$	Dx → CB	CB-Uap-Dx-A	$\delta 1(-)$	CB → Dx	Dx-CB-Uap-Dx-A	$\beta 0(+)$
Uap-Dx-B	$\beta 1(+)$		CB-Uap-Dx-B	$\delta 1(-)$		Dx-CB-Uap-Dx-B	$\beta 0(+)$
Uap-Dx-C	$\beta 1(+)$		CB-Uap-Dx-C	$\delta 1(-)$		Dx-CB-Uap-Dx-C	$\beta 0(+)$
Uap-Dx-D	$\beta 1(+)$		CB-Uap-Dx-D	$\delta 1(-)$		Dx-CB-Uap-Dx-D	$\beta 0(+)$
Cor-CB	$\epsilon 1(-)$	CB → Dx	Dx-Cor-CB	$\alpha 0(-)$	Dx → CB	CB-Dx-Cor-CB	$\epsilon 1(-)$
Uap-CB	$\delta 1(-)$		Dx-Uap-CB	$\beta 0(+)$		CB-Dx-Uap-CB	$\delta 1(-)$

Cada confórmero se clasificó como una potencial cepa en función de las propiedades bioquímicas evaluadas mediante el panel de caracterización. El nombre de cada potencial cepa se compone de tres caracteres que resumen las siguientes propiedades de cada confórmero:

- La letra del alfabeto griego representa el patrón electroforético presentado por el confórmero.
- Los valores numéricos 0 o 1 hacen referencia a la ausencia o presencia de barrera de transmisión a oveja ARQ, respectivamente.
- El signo positivo, (+), o negativo, (-), se correlaciona con la capacidad del confórmero de ser detectado o no, respectivamente, por el anticuerpo 12B2.

Nótese cómo todas las potenciales cepas generadas *de novo* cambian al ser adaptadas a un medio con condiciones de cofactor diferentes a las originales y recuperan sus propiedades bioquímicas al ser readaptadas a un medio con condiciones de cofactor iguales a las de origen. La única excepción es la de la potencial cepa $\alpha 0(-)$ correspondiente tres de las semillas de corzo obtenidas en presencia de dextrano sulfatado, que, tras evolucionar a $\gamma 1(+)$ al ser adaptadas a un entorno sin cofactor, acaban evolucionando a $\alpha 0(+)$ al ser readaptadas a su medio de origen. De este modo, los confórmeros recuperan dos de sus tres propiedades bioquímicas características, ganando la capacidad de ser detectados por el anticuerpo 12B2.

De entre los datos recogidos en la tabla 2, cabe reseñar cómo en todos los casos se produjeron cambios bioquímicos en las cepas potenciales al adaptar cada confórmero a un medio diferente al de origen, residiendo dicha diferencia en la presencia o ausencia del cofactor, aunque en algunos casos ese cambio fue reversible:

- La cepa potencial $\alpha 0(-)$ cambia su patrón electroforético al adaptarse a un medio sin cofactor, perdiendo su capacidad de propagación en sustrato basado en rec-PrP de oveja ARQ, pero pudiendo ser detectado por el anticuerpo 12B2. Estas nuevas características dan lugar a la cepa potencial $\gamma 1(+)$, la cual vuelve a sufrir modificaciones al ser adaptada a un medio con dextrano sulfatado. En este caso, mientras que el patrón electroforético vuelve a ser el de los confórmeros originales, al igual que su incapacidad para propagar en sustrato basado en rec-PrP de oveja ARQ, la nueva cepa potencial puede ser detectada por el anticuerpo 12B2, al contrario que la cepa potencial de origen, sugiriendo una evolución determinada por el medio de propagación.
- Al adaptar la cepa potencial $\beta 1(+)$ a un medio sin dextrano sulfatado, aunque mantiene su incapacidad para propagar en sustrato basado en rec-PrP de oveja ARQ, adquiere un nuevo patrón

RESULTADOS

electroforético y pierde su capacidad de ser detectada por el anticuerpo 12B2, dando lugar a la cepa $\delta 1(-)$. Esta cepa, al adaptarse a un medio con cofactor recupera el patrón del confórmero de origen, así como su capacidad de ser detectado por el anticuerpo 12B2, pero además adquiere la capacidad de propagar en sustrato basado en rec-PrP de oveja ARQ, habiéndose generado así una cepa potencial nueva e indicando nuevamente que la ausencia de cofactor conduce a cambios conformacionales.

- En el caso de las cepas potenciales de corzo y uapití generadas en ausencia de cofactor, $\epsilon 1(-)$ y $\delta 1(-)$, respectivamente, ambas se modifican al adaptarse a un medio con cofactor, aunque dicho cambio es reversible, ya que al volver a ser adaptada a un medio sin dextrano sulfatado recuperan las características de los confórmeros de origen. Cabe destacar que, cuando el confórmero Cor-CB es adaptado a un medio con dextrano sulfatado, la cepa potencial resultante, $\alpha 0(-)$, es la misma que la cepa potencial observada en la mayoría de las rec-PrP de corzo obtenidas por malplegamiento espontáneo *in vitro* en presencia de cofactor. Es, sin embargo, más reseñable el caso de la cepa potencial $\delta 1(-)$, correspondiente al confórmero de uapití Uap-CB y que es la misma cepa obtenida al adaptar a un medio sin cofactor la cepa $\beta 1(+)$. Cuando esta cepa potencial, $\delta 1(-)$, se adapta a un medio con dextrano sulfatado adquiere nuevas propiedades bioquímicas, dando lugar a la cepa $\beta 0(+)$, la misma que se obtuvo al readaptar a un medio con cofactor confórmeros con características de cepa $\delta 1(-)$ como CB-Uap-Dx-A. Estos resultados parecen señalar hacia una restricción de las propiedades de los confórmeros generados dependiente de la presencia del cofactor en el medio de propagación.

4.- Caracterización biológica de las PrP recombinantes de corzo y uapití malplegadas espontáneamente *in vitro* en presencia y ausencia de cofactor mediante inoculación en un modelo susceptible

Aunque se ha expuesto la capacidad de la PMSA de generar mediante malplegamiento espontáneo *in vitro* rec-PrP^{res} de corzo y uapití con características bioquímicas diferentes, aún no se ha demostrado que estos confórmeros constituyan verdaderos priones recombinantes *bona fide*. Además de la resistencia a PK y la capacidad de propagarse indefinidamente, otra de las características fundamentales de los *priones bona fide* es su capacidad para inducir una enfermedad priónica en un modelo animal. Para demostrar esto, se seleccionaron las semillas recombinantes de corzo y uapití obtenidas mediante malplegamiento espontáneo por PMSA en presencia y ausencia de cofactor: Cor-Dx-A, Cor-Dx-B, Cor-Dx-C, Cor-Dx-D, Uap-Dx-A, Uap-Dx-B, Uap-Dx-C, Uap-Dx-D, Cor-CB y Uap-CB. El modelo animal elegido para su inoculación fue el ratón transgénico que expresa la PrP^C del topillo rojo (variante polimórfica I109)

RESULTADOS

denominado TgVole. Además de comprobar si los confórmeros recombinantes de cérvido podían considerarse priones *bona fide*, la inoculación de estos en un modelo animal susceptible validaría el panel de caracterización bioquímica, permitiendo conocer de forma fehaciente si las semillas analizadas se trataban de cepas priónicas diferentes.

- **Propagación de las semillas recombinantes de cérvido en homogeneizados de encéfalos mediante PMCA**

Debido a la imposibilidad de predecir el comportamiento *in vivo* de las semillas recombinantes de cérvido y a las implicaciones éticas y económicas que conlleva el empleo de modelos animales, se llevó a cabo un estudio de propagación *in vitro* con el fin de obtener datos previos sobre su posible infectividad. La técnica empleada para ello, la PMCA, permite evaluar el potencial infectivo de un prion mediante la evaluación de la capacidad de este de propagar en sustratos basados en homogeneizados de encéfalo *in vitro* (400).

De este modo, se evaluó la infectividad *in vitro* de las diez semillas recombinantes de cérvido mediante el análisis de su propagación en homogeneizado de encéfalo de TgVole, el modelo considerado para el estudio *in vivo*, por rondas seriadas de PMCA. Partiendo de una dilución 1:10 de la semilla en el homogeneizado de encéfalo y manteniendo el mismo factor de dilución para las rondas seriadas, se llevaron a cabo dos rondas de 24 horas cada una, utilizándose dos réplicas técnicas para cada semilla y ocho réplicas sin semilla para controlar la aparición espontánea de PrP^{Sc} y confirmar la ausencia de contaminación cruzada. El resultado de las rondas de PMCA se analizó mediante su digestión con PK y posterior *Western blot*. En la figura 14a se puede observar la primera ronda de PMCA utilizando las semillas recombinantes de cérvido obtenidas por malplegamiento espontáneo por PMSA con dextrano sulfatado. Como se puede apreciar, todas las semillas fueron capaces de inducir el malplegamiento de la PrP^C presente en el sustrato en una sola ronda de PMCA, razón por la que no se muestra la segunda. En la figura 14b se muestran las dos rondas seriadas de PMCA en las que se ha utilizado las semillas recombinantes de cérvido generadas en ausencia de cofactor. En este caso fueron necesarias dos rondas de PMCA para lograr la propagación de la semilla, indicativos de una menor infectividad o de la posibilidad de tiempos de incubación más prolongados *in vivo*.

RESULTADOS

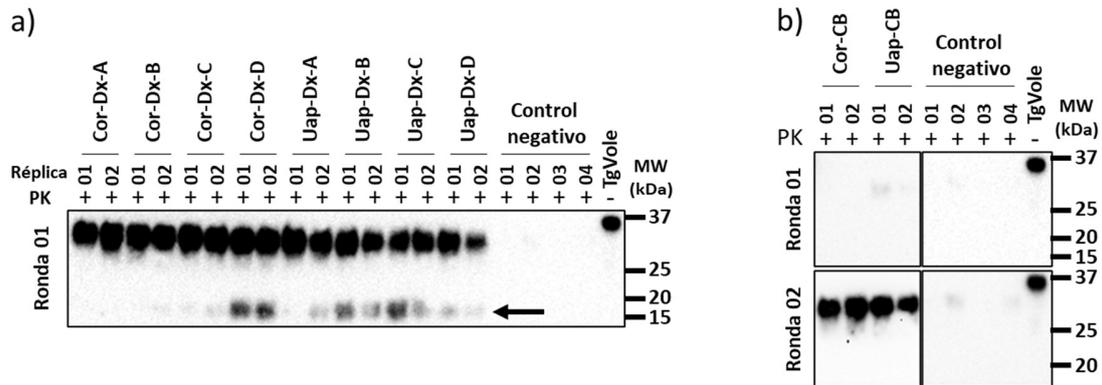


Figura 14. Determinación de la infectividad potencial *in vivo* de las rec-PrP^{res} de corzo y uapití evaluada mediante PMCA utilizando homogeneizado de encéfalo de ratones transgénicos TgVole como sustrato. a) Western blot de los productos resistentes a PK obtenidos tras una ronda de PMCA de 24 horas con las rec-PrP^{res} de corzo y uapití obtenidas por malplegamiento espontáneo *in vitro* en presencia de cofactor como semilla y utilizando homogeneizado de encéfalo de ratones TgVole como sustrato. **b)** Western blot de los productos resistentes a PK obtenidos tras dos rondas seriadas de PMCA de 24 horas cada una con las rec-PrP^{res} de corzo y uapití obtenidas por malplegamiento espontáneo *in vitro* en ausencia de cofactor como semilla y utilizando homogeneizado de encéfalo de ratones TgVole como sustrato. La segunda ronda se llevó a cabo mediante la dilución 1:10 de los productos de la primera ronda en sustrato. La capacidad de propagación se evaluó mediante digestión con PK de los productos de cada ronda de PMCA, electroforesis y Western Blot utilizando el anticuerpo monoclonal BAR224 (1:1000). Todas las rec-PrP^{res} diluidas 1:10 fueron capaces de malplegar *in vitro* la PrP^C presente en homogeneizado de cerebro de TgVole, indicando potencial infectividad *in vivo*. Se ha señalado con una flecha negra la señal de 16kDa, correspondiente a la rec-PrP^{res} de la semilla utilizada. TgVole: homogeneizado de encéfalo de ratones TgVole sin digerir utilizado como sustrato, MW: marcador de masa molecular.

Si bien los resultados descritos ya eran de por sí indicativos de la potencial capacidad infectiva de las semillas recombinantes de cérvido analizadas, se llevaron a cabo dos pruebas de PMCA adicionales con el objetivo de demostrar su potencial infectivo también en las especies de origen, a pesar de carecer de modelos animales disponibles con PrP^C de corzo o uapití, respectivamente. Una utilizando como sustrato homogeneizado de córtex frontal de corzo y la otra utilizando homogeneizado de córtex frontal de ciervo rojo. El DNA genómico de estos animales fue secuenciado y ambos resultaron homocigotos para el gen *PRNP*, mostrando el corzo una PrP^C con secuencia idéntica a la de las semillas recombinantes de corzo (Q226Q) y el ciervo rojo una PrP^C con la misma secuencia aminoacídica que las semillas recombinantes de uapití (Q226E). Las rondas seriadas de PMCA se llevaron a cabo igual que las descritas en la sección anterior, con la única diferencia de que en este caso cada ronda fue de 48 horas de duración.

En la figura 15a se observa cómo todas las semillas recombinantes generadas *in vitro* en presencia de cofactor se propagaron en el homogeneizado de córtex de corzo en la primera ronda, aunque con una eficiencia variable. Esta diferencia puede deberse a que, al partir de semillas líquidas, estas tuvieron un

RESULTADOS

título distinto. En cualquier caso, la segunda ronda de PMCA muestra una propagación eficiente en todas ellas, con la salvedad de una réplica técnica de la semilla Cor-Dx-D. No obstante, como la réplica técnica correspondiente al primer pase fue positiva al ser analizada por *Western blot*, el resultado negativo de la segunda ronda se deba probablemente a un error técnico. En la figura 15b se observa el resultado de las rondas de PMCA seriada utilizando los confórmeros Cor-CB y Uap-CB como semilla. En este caso, mientras que Cor-CB indujo el malplegamiento de la PrP^C del sustrato de forma leve en la primera ronda y eficientemente en la segunda, Uap-CB fue incapaz de propagar en el homogeneizado de córtex de corzo en ninguna de las dos rondas.

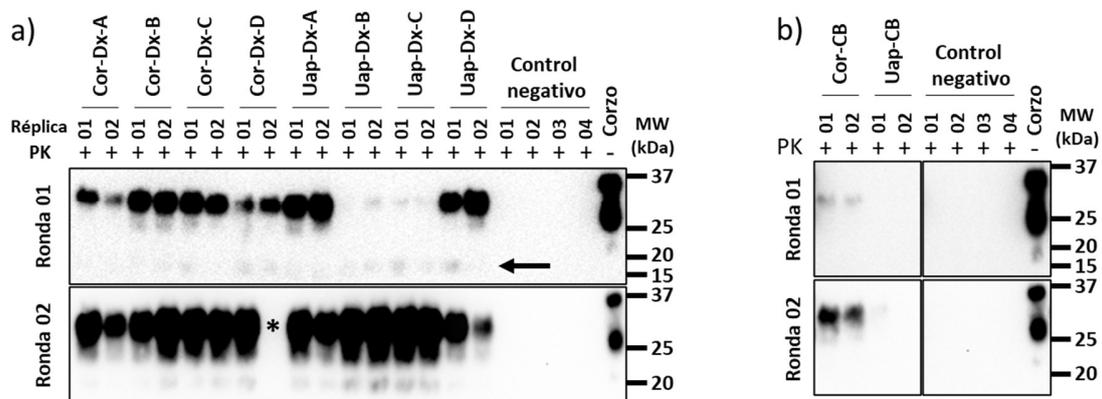


Figura 15. Determinación de la infectividad potencial *in vivo* de las rec-PrP^{res} de corzo y uapití evaluada mediante PMCA utilizando homogeneizado de córtex de corzo como sustrato. a) *Western blot* de los productos resistentes a PK obtenidos tras dos rondas seriadas de PMCA de 24 horas con las rec-PrP^{res} de corzo y uapití obtenidas por malplegamiento espontáneo *in vitro* en presencia de cofactor como semilla y utilizando homogeneizado de córtex de corzo como sustrato. **b)** *Western blot* de los productos resistentes a PK obtenidos tras dos rondas seriadas de PMCA de 24 horas cada una con las rec-PrP^{res} de corzo y uapití obtenidas por malplegamiento espontáneo *in vitro* en ausencia de cofactor como semilla y utilizando homogeneizado de córtex de corzo como sustrato. La segunda ronda se llevó a cabo mediante la dilución 1:10 de los productos de la primera ronda en sustrato. La capacidad de propagación se evaluó mediante digestión con PK de los productos de cada ronda de PMCA, electroforesis y Western Blot utilizando el anticuerpo monoclonal BAR224 (1:1000). Todas las rec-PrP^{res} diluidas 1:10 fueron capaces de malplegar *in vitro* la PrP^C presente en homogeneizado de córtex de corzo, indicando potencial infectividad *in vivo*. Se ha señalado con una flecha negra la señal de 16kDa, correspondiente a la rec-PrP^{res} de la semilla utilizada. Se ha marcado con un asterisco (*) una muestra que dio señal positiva en la primera ronda y negativa en la segunda debido a un error técnico. Corzo: homogeneizado de córtex de corzo sin digerir utilizado como sustrato, MW: marcador de masa molecular.

Finalmente, en la figura 16a se muestra el resultado de las dos rondas de PMCA seriada utilizando las semillas recombinantes generadas en presencia de dextrano sulfatado y sustrato basado en homogeneizado de córtex de ciervo rojo. Si bien con una menor eficiencia que en el caso del sustrato basado en córtex de corzo, también se observó una propagación de todas las semillas analizadas en la segunda ronda. En la figura 16b se aprecia cómo el confórmero Cor-CB requirió de dos rondas seriadas

RESULTADOS

para propagar en este sustrato por PMCA y, aun así, presentó una propagación ineficiente, mientras que el confórmero Uap-CB no propagó en absoluto, incluso contando con la misma secuencia aminoacídica que la PrP^C presente en el sustrato.

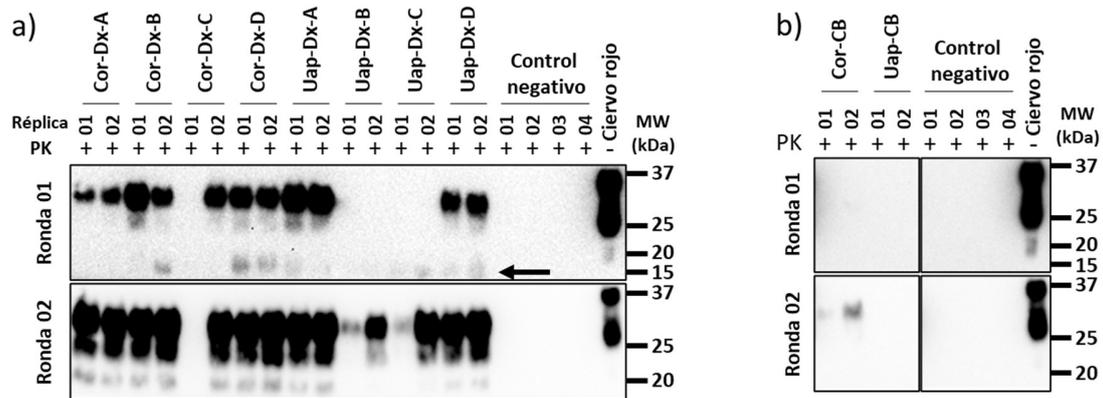


Figura 16. Determinación de la infectividad potencial *in vivo* de las rec-PrP^{res} de corzo y uapití evaluada mediante PMCA utilizando homogeneizado de córtex de ciervo rojo como sustrato. a) *Western blot* de los productos resistentes a PK obtenidos tras dos rondas seriadas de PMCA de 24 horas con las rec-PrP^{res} de corzo y uapití obtenidas por malplegamiento espontáneo *in vitro* en presencia de cofactor como semilla y utilizando homogeneizado de córtex de ciervo rojo como sustrato. **b)** *Western blot* de los productos resistentes a PK obtenidos tras dos rondas seriadas de PMCA de 24 horas cada una con las rec-PrP^{res} de corzo y uapití obtenidas por malplegamiento espontáneo *in vitro* en ausencia de cofactor como semilla y utilizando homogeneizado de córtex de ciervo rojo como sustrato. La segunda ronda se llevó a cabo mediante la dilución 1:10 de los productos de la primera ronda en sustrato. La capacidad de propagación se evaluó mediante digestión con PK de los productos de cada ronda de PMCA, electroforesis y Western Blot utilizando el anticuerpo monoclonal BAR224 (1:1000). A excepción de Uap-CB, el resto de rec-PrP^{res} diluidas 1:10 fueron capaces de malplegar *in vitro* la PrP^C presente en homogeneizado de córtex de ciervo rojo, indicando potencial infectividad *in vivo*. Se ha señalado con una flecha negra la señal de 16kDa, correspondiente a la rec-PrP^{res} de la semilla utilizada. Se ha marcado con un asterisco (*) una muestra que dio señal positiva en la primera ronda y negativa en la segunda debido a un error técnico. Ciervo rojo: homogeneizado de córtex de ciervo rojo sin digerir utilizado como sustrato, MW: marcador de masa molecular.

El resultado mayoritariamente positivo en la PMCA sugirió que todas las semillas recombinantes de cérvido analizadas podrían presentar un comportamiento infeccioso en TgVole y, a excepción de Uap-CB, también en cérvidos, aunque el resultado negativo de este confórmero podría deberse a un menor título o ser un reflejo de tiempos de incubación más prolongados, sin poder descartar que fuese capaz de malplegar la PrP^C en rondas seriadas posteriores.

- **Estudio de la infectividad *in vivo* de las semillas recombinantes de cérvidos mediante bioensayo**

Tras el éxito obtenido con el experimento de propagación *in vitro* utilizando homogeneizado de encéfalo de TgVole por PMCA, las diez semillas recombinantes de cérvidos fueron utilizadas en un

RESULTADOS

bioensayo, con el fin de determinar si debían ser consideradas priones *bona fide* y de este modo clasificarlas definitivamente como cepas diferentes en función de sus propiedades biológicas.

Para ello, los diez confórmers seleccionados se inocularon intracerebralmente en TgVole, ratones transgénicos que expresan la variante polimórfica I109 de la PrP^C del topillo rojo. Este modelo animal ha sido ampliamente estudiado en ensayos previos, habiendo sido probada su susceptibilidad a la infección con priones procedentes de cérvidos (referencia CWD-TgVole). También se conoce la particularidad que presentan algunos animales envejecidos de este modelo transgénico, siempre y cuando se da una sobreexpresión de PrP^C, de desarrollar una enfermedad priónica atípica de forma espontánea (referencia). Aunque en este caso se utilizaron TgVole que expresaban la PrP^C de topillo rojo ~1x y, por tanto, no se esperaba el desarrollo de esta enfermedad durante su esperanza de vida, la posibilidad de que alguna de las rec-PrP^{res} inoculadas pudiera acelerar una potencial patología espontánea se tuvo en cuenta en el análisis histopatológico. De esta manera, no se consideraría prion recombinante *bona fide* cualquier rec-PrP^{res} que indujese una patología surgida espontáneamente, similar a la ya caracterizada en ratones transgénicos con sobreexpresión.

En el momento de la escritura de esta tesis doctoral, el bioensayo llevado a cabo con cinco de los diez inóculos había finalizado. Estos cinco inóculos, Cor-Dx-C, Cor-Dx-D, Uap-Dx-A, Uap-Dx-D y Cor-CB, indujeron una enfermedad priónica en el modelo transgénico con una tasa de ataque del 100% y distintos períodos de incubación, demostrando así las características propias de los priones *bona fide*. El estudio *in vivo* con los otros cinco inóculos (Cor-Dx-A, Cor-Dx-B, Uap-Dx-B, Uap-Dx-C, Uap-CB) aún no había finalizado, pero ya se había observado la capacidad de la mayoría de ellos para inducir una prionopatía en los modelos animales inoculados, contándose con al menos un animal en prácticamente todos los grupos que presentaba signos neurológicos característicos de una enfermedad priónica. El resumen del estudio de infectividad de estos inóculos en TgVole se recoge en la tabla 3. En ella se puede apreciar tanto la potencial cepa asociada a cada inóculo tras su caracterización bioquímica, como el tiempo de incubación necesario para inducir signos clínicos en el animal inoculado (días postinoculación \pm error estándar de la media o dpi \pm SEM, del inglés, *days post inoculation \pm standard error of the mean*). Se observó una dispersión en los dpi requeridos por cada inóculo para causar la enfermedad ligeramente mayor de la estándar para un primer pase. Esto podría deberse a fluctuaciones típicas en este pase *in vivo*, derivadas de una potencial adaptación del inóculo recombinante a la propagación a expensas de la PrP^C, glicosilada y anclada a membrana mediante GPI. Es de esperar que un necesario segundo pase sirva para la estabilización de las cepas, mostrando un tiempo de incubación más corto y determinante para la

RESULTADOS

clasificación definitiva de estas. En este segundo pase, planificado, pero aún no llevado a cabo, los inóculos se encontrarían ya adaptados al genotipo del animal inoculado y a las modificaciones postraduccionales de las que carecían originalmente al tratarse de proteínas recombinantes, estabilizándose también sus características de cepa. No obstante, el análisis del primer pase sería suficiente para determinar la existencia de características histopatológicas distinguibles y, por tanto, definir si las rec-Pr^{P^{res}} inoculadas podrían representar distintas cepas tal y como indica la caracterización bioquímica.

Tabla 3. Estudio de la infectividad de los confórmers de corzo y uapití obtenidos por malplegamiento espontáneo in vitro en presencia y ausencia de cofactor mediante inoculación en ratones transgénicos TgVole.

Inóculo	Potencial cepa	Tasa de ataque ^v	Tiempo de incubación (dpi ± SEM)
Cor-Dx-A*	α0(-)	4/4; (4, > 256)	195 ± 18
Cor-Dx-B*	α0(-)	2/2; (6, > 256)	239 ± 1
Cor-Dx-C	α0(-)	4/4	191 ± 25
Cor-Dx-D	β1(+)	7/7	342 ± 33 [#]
Uap-Dx-A	β1(+)	9/9	277 ± 24
Uap-Dx-B*	β1(+)	0/6	> 213
Uap-Dx-C	β1(+)	7/7	192 ± 30
Uap-Dx-D*	β1(+)	3/3; (2, > 213)	187 ± 10
Cor-CB	ε1(-)	5/5	134 ± 11
Uap-CB*	δ1(-)	5/5; (2, > 381)	145 ± 14

Cada confórmero analizado se agrupó en potenciales cepas en función de las propiedades bioquímicas evaluadas mediante el panel de caracterización. El nombre de potencial cepa asignado a cada confórmero resume estas propiedades:

- La letra del alfabeto griego representa el patrón electroforético presentado por el confórmero.
- Los valores numéricos 0 o 1 hacen referencia a la ausencia o presencia de barrera de transmisión a oveja ARQ, respectivamente.
- El signo positivo, (+), o negativo, (-), se correlaciona con la capacidad del confórmero de ser detectado o no, respectivamente, por el anticuerpo 12B2.

Nótese cómo todas las potenciales cepas generadas *de novo* cambian al ser adaptadas a un medio con condiciones de cofactor diferentes a las originales y recuperan sus propiedades bioquímicas al ser readaptadas a un medio con condiciones de cofactor iguales a las de origen. La única excepción es la de la potencial cepa α0(-) correspondiente tres de las semillas de corzo obtenidas en presencia de dextrano sulfatado, que, tras evolucionar a γ1(+) al ser adaptadas a un entorno sin cofactor, acaban evolucionando a α0(+) al ser readaptadas a su medio de origen. De este modo, los confórmers recuperan dos de sus tres propiedades bioquímicas características, ganando la capacidad de ser detectados por el anticuerpo 12B2.

De este modo se puede observar cómo los inóculos Cor-Dx-A, Cor-Dx-B y Cor-Dx-C, los cuales habían sido caracterizadas bioquímicamente como la misma cepa, α0(-), presentaron tiempos de incubación aparentemente diferentes. Cor-Dx-C, el único de estos tres inóculos para el que el bioensayo había concluido, mostró un tiempo de incubación de 191 ± 25 dpi, Cor-Dx-A indujo signos clínicos en cuatro ratones tras 195 ± 18 dpi, habiendo otros cuatro ratones sanos tras 256 dpi y, de forma similar,

RESULTADOS

Cor-Dx-B indujo una enfermedad priónica en dos ratones tras 239 ± 1 dpi, mientras que otros seis permanecen sanos después de 256 dpi. Sin embargo, no es posible concluir si estos tres inóculos se corresponden con la misma cepa o no hasta el punto final del bioensayo, ya que las diferencias entre los tiempos de incubación definitivos podrían ser pequeñas y deberse a las fluctuaciones propias del primer pase en animales ya mencionadas. De este modo, los inóculos descritos no podrían relacionarse con cepas distintas considerando únicamente los tiempos de incubación, siendo necesario el estudio anatomopatológico, aunque resultaría indicativo en caso de observarse grandes diferencias. Por otro lado, el inóculo Cor-Dx-D, el único de los obtenidos a partir de la rec-PrP de corzo que fue caracterizado como $\beta 1(+)$, mostró unos tiempos de incubación mucho mayores que los de los caracterizados como $\alpha 0(-)$, alcanzando los 342 ± 33 dpi (Tabla 3, Figura 17a). Los encéfalos de los ratones transgénicos inoculados con Cor-Dx-C y Cor-Dx-D, los dos inóculos para los que el estudio *in vivo* había finalizado, fueron analizados mediante WB con el fin de determinar la presencia de PrP^{Sc} resistente a la digestión con PK y su patrón electroforético. De esta manera, aunque en un principio la PrP^{Sc} presente en estos encéfalos produjo señales con intensidad muy baja o indetectable al ser analizada por WB, tras la concentración de la muestra, su detección fue posible en todas ellas. En la figura 17b se pueden observar dos muestras representativas de cada inóculo, reconociéndose un patrón electroforético clásico con una mayor intensidad de señal en la banda correspondiente a la forma diglicosilada de la PrP^{res}, descartando así la posibilidad de una enfermedad priónica atípica desarrollada de forma espontánea.

RESULTADOS

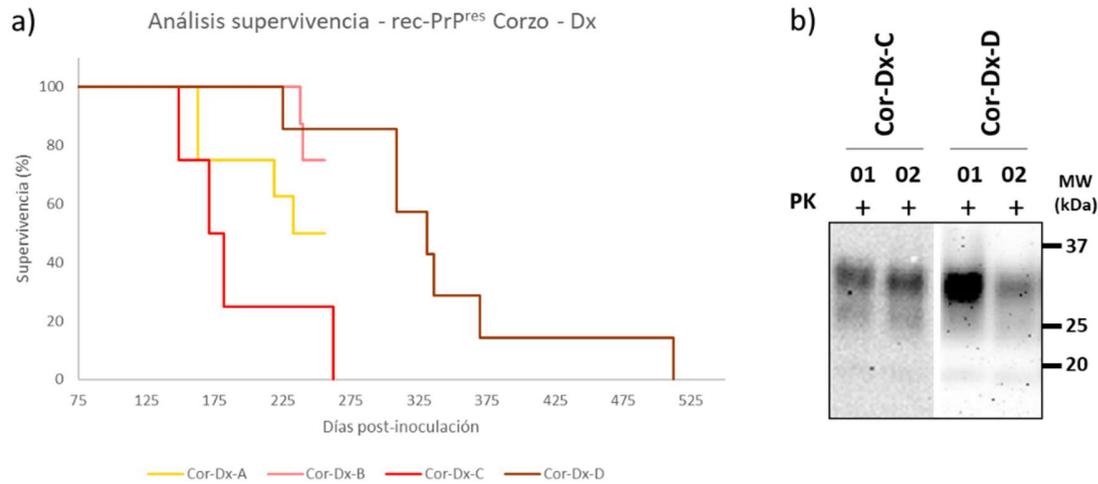


Figura 17. Estudio de la supervivencia y detección de PrP^{Sc} de los ratones TgVole inoculados con los confórmers de corzo obtenidos por malplegamiento espontáneo en presencia de cofactor. a) Análisis de la supervivencia de los ratones TgVole inoculados con Cor-Dx-A (amarillo), Cor-Dx-B (rosa), Cor-Dx-C (rojo) y Cor-Dx-D (marrón) mediante su representación en curvas de supervivencia de Kaplan-Meier. Los grupos de ratones inoculados con confórmers para los que el bioensayo había concluido muestran diferencias claras en los tiempos de incubación. Así, Cor-Dx-C destaca por sus tiempos de incubación cortos y de baja dispersión, mientras que Cor-Dx-D se caracteriza por tiempos de incubación más largos y con mayor dispersión. b) La mitad del encéfalo de los ratones TgVole que presentaron signos compatibles con una enfermedad priónica tras su inoculación fue homogeneizada y digerida con PK para la posterior detección de PrP^{Sc} mediante electroforesis y *Western blot*, utilizando para ello el anticuerpo D18 (1:5000). Este análisis, incompleto y limitado únicamente a aquellos grupos de animales inoculados con un confórmer cuyo bioensayo había concluido, permitió la detección de PrP^{Sc} en los encéfalos de los ratones inoculados con Cor-Dx-C y Cor-Dx-D, confirmando la infección priónica. Se observaron patrones de movilidad clásicos con baja concentración de PrP^{Sc}, como se puede observar en las dos muestras representativas de cada inóculo mostradas. MW: Marcador de masa molecular.

Los estudios anatomopatológicos de los encéfalos de los modelos transgénicos inoculados con Cor-Dx-C y Cor-Dx-D mostraron además perfiles lesionales diferentes (Figura 18a y 18e). En el caso del inóculo Cor-Dx-C, las lesiones espongiiformes se acumularon en el hipocampo, el cuerpo estriado, el tálamo y el mesencéfalo, áreas en las que también se concentró más cantidad de depósitos de PrP^{Sc}, especialmente en el hipocampo, si bien se detectaron depósitos en casi todas las secciones del cerebro analizadas (Figura 18a). Sin embargo, se observó bastante variabilidad entre los diferentes ratones inoculados, sobre todo en el ya mencionado hipocampo. En esta región, algunos animales presentaron depósitos de PrP^{Sc} en forma de placas, mientras que otros presentaron lesiones más severas con un patrón punteado fino en la capa externa (Figuras 18b y 18c). No obstante, en otras regiones aparecieron características comunes, como depósitos de PrP^{Sc} con patrón sináptico en el tálamo (Figura 18d). En el caso del inóculo Cor-Dx-D, se observaron cambios espongiiformes especialmente acusados en el tálamo y el cuerpo estriado, aunque también presentes en el tálamo, el mesencéfalo y el cerebelo. En cuanto a los

RESULTADOS

depósitos de PrP^{Sc}, estos se localizaron principalmente en el hipocampo, el estriado, el tálamo y el mesencéfalo (Figura 18e). En el hipocampo se pudieron apreciar agregados de PrP^{Sc} sin gliosis asociada (Figura 18f), a diferencia del cuerpo estriado, donde, además de un patrón de inmunomarcaje del tipo sináptico, también se diferenció un patrón glial en los agregados de PrP^{Sc} (Figura 18g). Así, este inóculo se caracteriza por un tropismo por el tálamo y el mesencéfalo, donde el inmunomarcaje observado fue de tipo sináptico (Figura 18h). Por último, cabe destacar una apoptosis de los gránulos de la corteza cerebelosa observada en algún animal.

En el caso de estos dos inóculos de corzo obtenidos por PMSA en presencia de dextrano, se puede afirmar que se tratan de cepas diferentes, coincidiendo el panel de caracterización bioquímica *in vitro* con el bioensayo, donde tanto los tiempos de incubación como los estudios anatomopatológicos pusieron de manifiesto diferencias notables no atribuibles únicamente a diferencias de cantidad de rec-PrP^{res} de los inóculos utilizados.

RESULTADOS

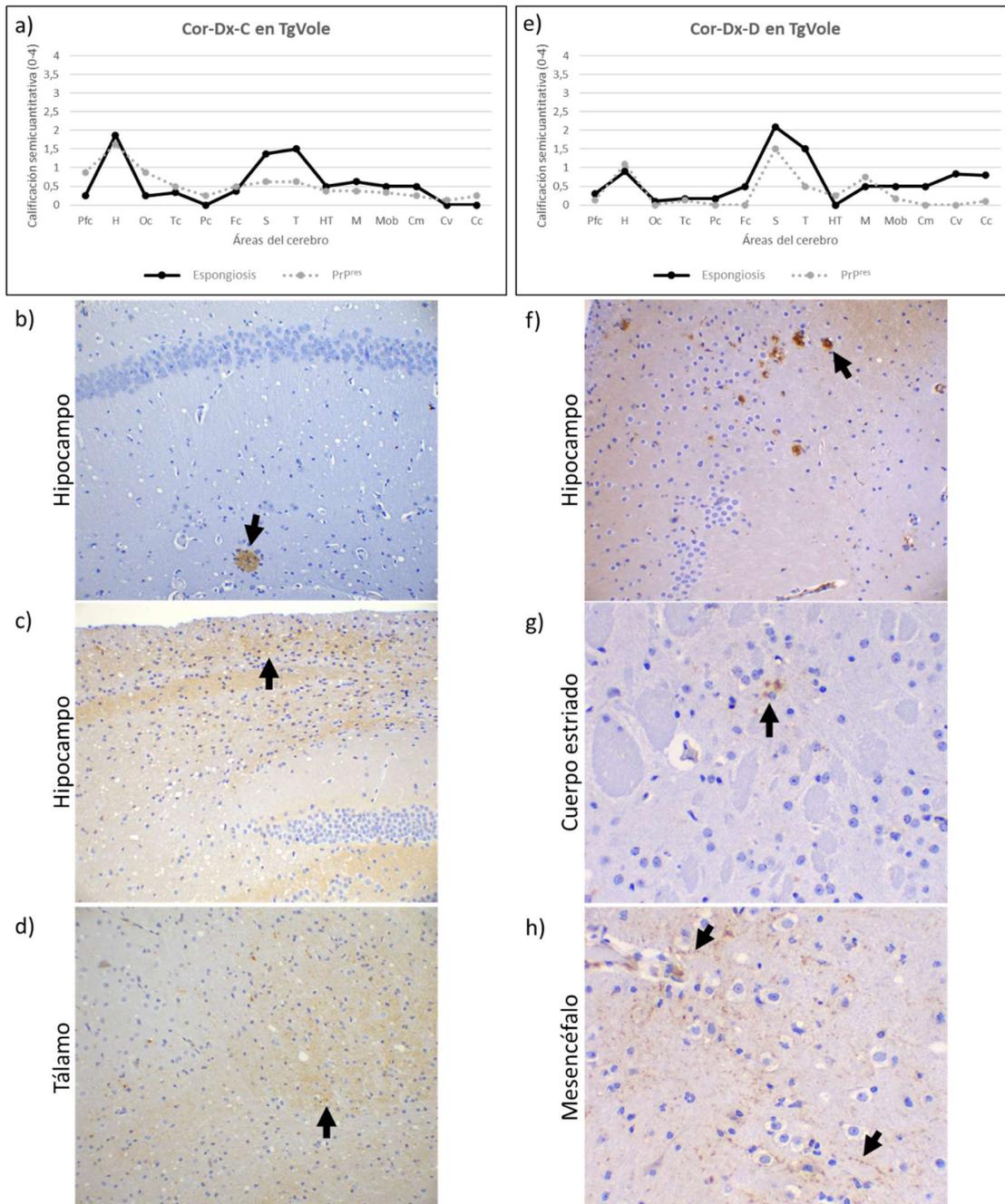


Figura 18. Perfil lesional de los ratones transgénicos TgVole inoculados con Cor-Dx-C y Cor-Dx-D y análisis histopatológico de sus encéfalos. Una de las mitades de los encéfalos de los TgVole inoculados con Cor-Dx-C y Cor-Dx-D fue fijada con paraformaldehído y embebida en parafina, para posteriormente realizar cortes que se destinaron a la tinción con hematoxilina-eosina (H/E) para evaluar lesiones espongiformes y al estudio inmunohistoquímico para la detección de PrP^{Sc}, utilizando el anticuerpo 6C2 (1:1000). **a)** Perfil lesional de los TgVole inoculados con Cor-Dx-C. Las lesiones espongiformes se acumularon en el hipocampo, el cuerpo estriado, el tálamo y el mesencéfalo, áreas en las que también se concentraron las mayores cantidades de depósitos de PrP^{Sc}. Estos depósitos de PrP^{Sc} se pueden observar **b)** en el hipocampo, con patrón en placa, **c)** en la capa externa del hipocampo, con patrón punteado fino y **d)** en el tálamo, con patrón en placa. **e)** Perfil lesional de los TgVole inoculados con Cor-Dx-D. Se observaron cambios espongiformes y depósitos de PrP^{Sc} especialmente acusados en el tálamo, el cuerpo estriado, el hipocampo y el mesencéfalo. Los depósitos de PrP^{Sc} se pueden observar **f)** en el hipocampo, con patrón de agregados, **c)** en el cuerpo estriado, con patrón glial y **d)** en el mesencéfalo, con patrón sináptico. Pfc: córtex piriforme, H: hipocampo, Oc: córtex occipital, Tc: córtex temporal, Pc: córtex parietal, Fc: córtex frontal, S: cuerpo estriado, T: tálamo, HT: hipotálamo, M: mesencéfalo, Mob: médula oblonga, Cm: núcleos cerebelares, Cv: vermis cerebelar, Cc: córtex cerebelar.

RESULTADOS

Volviendo a los inóculos de uapití obtenidos por malplegamiento espontáneo en presencia de dextrano, todos ellos fueron considerados como la misma cepa, $\beta 1(+)$, tras la aplicación del panel de caracterización *in vitro*. Al igual que con los inóculos de corzo caracterizados como $\alpha 0(-)$, los ratones transgénicos inoculados con estos cuatro inóculos de uapití mostraron tiempos de incubación variados (Tabla 3, Figura 19a). El inóculo Uap-Dx-A, en el momento final de su bioensayo, se caracterizó por una tasa de ataque del 100% tras 277 ± 24 días desde su inoculación en TgVole. Por otra parte, el inóculo Uap-Dx-B fue el único que no causó enfermedad priónica en los animales inoculados en el momento en que esta tesis fue escrita, a los 213 días tras su inoculación. El inóculo Uap-Dx-C es el segundo de este grupo cuyo estudio *in vivo* había finalizado, también con una tasa de ataque del 100% y tiempos de incubación menores, de 192 ± 30 días. Por último, el inóculo Uap-Dx-D indujo la enfermedad priónica en 3 de los 5 animales inoculados en el momento de la escritura de esta tesis doctoral, a los 187 ± 10 días, habiendo aún dos ratones sin signos neurológicos a los 213 días tras la inoculación. En el caso de los tiempos de incubación necesarios para los inóculos Uap-Dx-A y Uap-Dx-C, las diferencias observadas fueron notables (Tabla 3, Figura 19a), aunque de nuevo estas podrían deberse a las fluctuaciones observadas en el primer pase de un bioensayo, siendo necesario el análisis anatomopatológico su clasificación como cepas diferentes o iguales. Los encéfalos de los ratones inoculados con Uap-Dx-A y Uap-Dx-C, los dos inóculos cuyo bioensayo había finalizado, fueron analizados por WB previa digestión con PK. El resultado de dos muestras representativas de cada inóculo se puede observar en la figura 19b, en la que se aprecia un patrón electroforético clásico con una baja intensidad de señal y, en algunos casos, nula. Se llevó a cabo la concentración de las muestras cuya PrP^{Sc} no pudo ser detectada, obteniéndose así un patrón electroforético clásico con mayor intensidad de señal en la banda correspondiente a la isoforma diglicosilada de la PrP^{Sc}, al igual que en aquellas muestras que no requirieron de concentración.

RESULTADOS

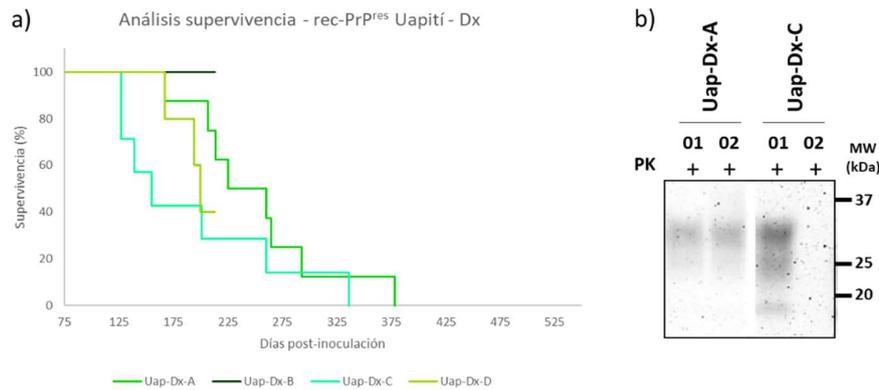


Figura 19. Estudio de la supervivencia y detección de PrP^{Sc} de los ratones TgVole inoculados con los confórmers de uapití obtenidos por malplegamiento espontáneo en presencia de cofactor. a) Análisis de la supervivencia de los ratones TgVole inoculados con Uap-Dx-A (verde), Cor-Dx-B (verde oscuro), Cor-Dx-C (verde azulado) y Cor-Dx-D (verde claro) mediante su representación en curvas de supervivencia de Kaplan-Meier. Los grupos de ratones inoculados con confórmers para los que el bioensayo había concluido muestran diferencias en los tiempos de incubación. Así, Uap-Dx-A presenta tiempos de incubación más largos y con menor dispersión, mientras que Uap-Dx-C muestra tiempos de incubación más cortos, pero con mayor dispersión. **b)** La mitad del encéfalo de los ratones TgVole que presentaron signos compatibles con una enfermedad priónica tras su inoculación fue homogeneizada y digerida con PK para la posterior detección de PrP^{Sc} mediante electroforesis y *Western blot*, utilizando para ello el anticuerpo D18 (1:5000). Este análisis, incompleto y limitado únicamente a aquellos grupos de animales inoculados con un confórmer cuyo bioensayo había concluido, permitió la detección de PrP^{Sc} en los encéfalos de los ratones inoculados con Uap-Dx-A y Uap-Dx-C, confirmando la infección priónica. Se observaron patrones de movilidad clásicos con baja concentración de PrP^{Sc}, en algunos casos indetectable sin concentración previa, tal y como se puede observar en las dos muestras representativas de cada inóculo mostradas. MW: Marcador de masa molecular.

Con respecto a los estudios anatomopatológicos de los modelos transgénicos inoculados con Uap-Dx-A y Uap-Dx-C, los perfiles lesionales mostraron diferencias remarcables, a pesar de haber sido considerados como la misma cepa tras su caracterización *in vitro* (Figura 20a y 20e). En el inóculo Uap-Dx-A, las lesiones espongiiformes se concentraron principalmente en el hipocampo, el cuerpo estriado, el tálamo y el mesencéfalo, mientras que los depósitos de PrP^{Sc} se hallaron en mayor medida en el hipocampo, el córtex occipital, el cuerpo estriado, el mesencéfalo y, en menor medida, en el córtex cerebeloso (Figura 20a). Estos depósitos se detectaron principalmente en forma de placas y agregados proteicos como se puede observar en las figuras 20b, 20c y 20d en el hipocampo, el cuerpo estriado y la corteza cerebelosa, respectivamente. Por su parte, el inóculo Uap-Dx-C mostró cambios espongiiformes repartidos por casi todas las áreas del cerebro, siendo especialmente prominentes en el hipocampo y el cuerpo estriado, seguidos por el córtex piriforme, el córtex occipital, el córtex temporal y el tálamo (Figura 20e). Los depósitos de PrP^{Sc} se detectaron mayoritariamente con un patrón punteado en la capa externa del hipocampo (Figura 20f), con un patrón granular en el cuerpo estriado (Figura 20g) y con un patrón

RESULTADOS

punteado en el tálamo (Figura 20h). De este modo, este inóculo se caracteriza por afectar principalmente el hipocampo, produciendo espongiosis, gliosis y muerte de las células piramidales en él, y por inducir apoptosis en los gránulos de cerebelo.

En el caso de estos dos inóculos analizados, se puede concluir que son priones *bona fide* capaces de producir una enfermedad priónica en modelos animales con tiempos de incubación y características anatomopatológicas diferentes, lo que sugiere que se tratan de cepas diferentes, a pesar de haber sido ambas caracterizadas como la misma potencial cepa, $\beta 1(+)$, mediante su caracterización *in vitro*.

RESULTADOS

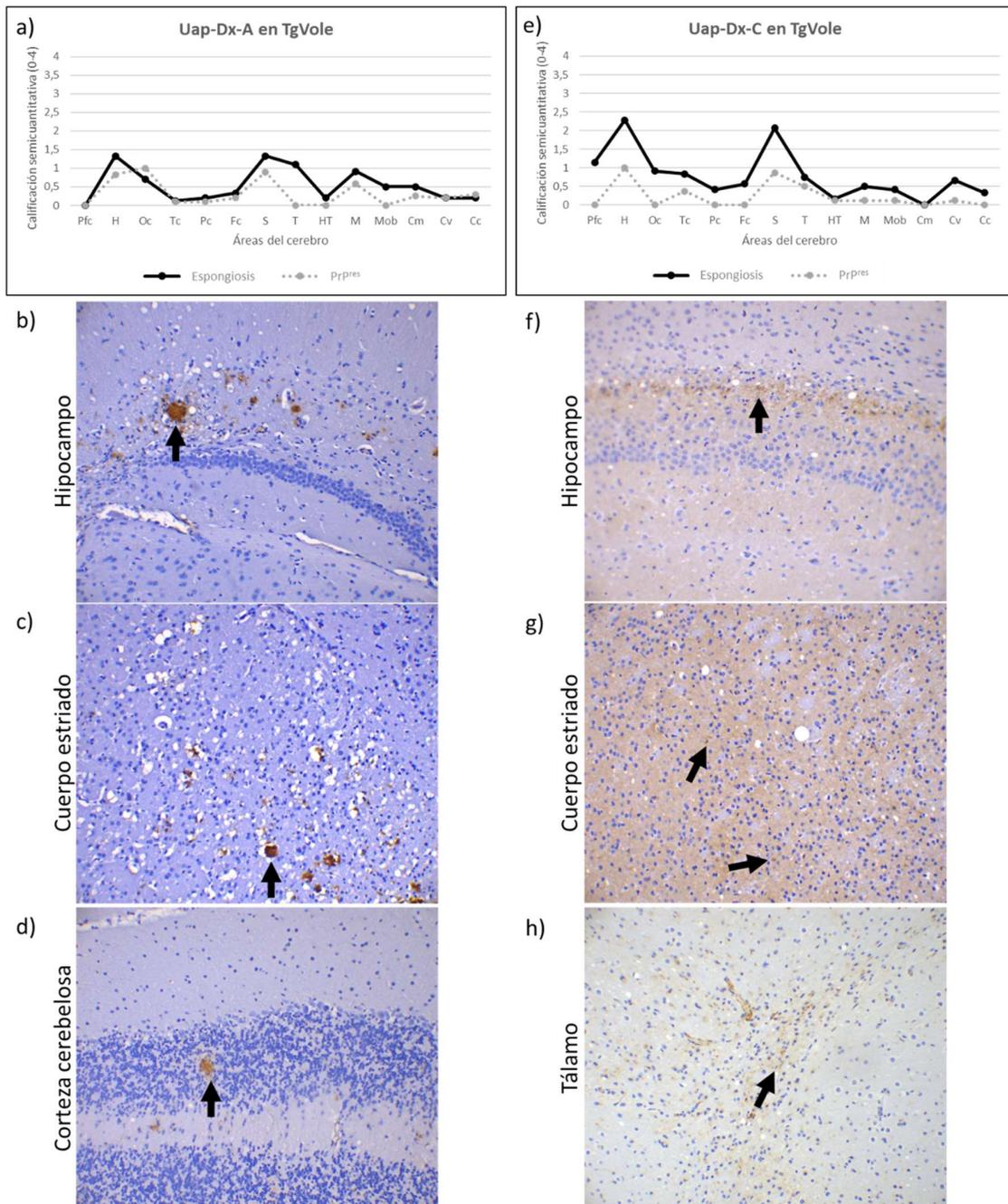


Figura 20. Perfil lesional de los ratones transgénicos TgVole inoculados con Uap-Dx-A y Uap-Dx-C y análisis histopatológico de sus encéfalos. Una de las mitades de los encéfalos de los TgVole inoculados con Uap-Dx-A y Uap-Dx-C fue fijada con paraformaldehído y embebida en parafina, para posteriormente realizar cortes que se destinaron a la tinción con hematoxilina-eosina (H/E) con el fin de evaluar lesiones espongiiformes y al estudio inmunohistoquímico para la detección de PrP^{Sc}, utilizando el anticuerpo 6C2 (1:1000). **a)** Perfil lesional de los TgVole inoculados con Uap-Dx-A. Las lesiones espongiiformes se concentraron en el hipocampo, el cuerpo estriado, el tálamo y el mesencéfalo. Los depósitos de PrP^{Sc} se hallaron en el hipocampo, los córtex occipital y cerebeloso, el cuerpo estriado y el mesencéfalo. Estos depósitos de PrP^{Sc} se pueden observar **b)** en el hipocampo, con patrón en placa, **c)** en el cuerpo estriado, con patrón de agregados y **d)** en la corteza cerebelosa, con patrón de agregados. **e)** Perfil lesional de los TgVole inoculados con Uap-Dx-C. Se observaron cambios espongiiformes repartidos por casi todo el cerebro, especialmente en el hipocampo y el cuerpo estriado. Los depósitos de PrP^{Sc} se detectaron mayoritariamente **f)** en la capa externa del hipocampo, con un patrón punteado, **g)** en el cuerpo estriado, con un patrón granular y **h)** en el tálamo, con un patrón punteado. Pfc: córtex priforme, H: hipocampo, Oc: córtex occipital, Tc: córtex temporal, Pc: córtex parietal, Fc: córtex frontal, S: cuerpo estriado, T: tálamo, HT: hipotálamo, M: mesencéfalo, Mob: médula oblonga, Cm: núcleos cerebelares, Cv: vermis cerebelar, Cc: córtex cerebelar.

RESULTADOS

Por último, los modelos transgénicos TgVole inoculados con los confórmeros de corzo y uapití obtenidos por malplegamiento espontáneo *in vitro* en ausencia de dextrano sulfatado mostraron unos tiempos de incubación cortos con un SEM menor que los observados en otros inóculos (Tabla 3, Figura 21a). El inóculo Cor-CB, caracterizado como la potencial cepa, $\epsilon 1(-)$, mostró una tasa de ataque del 100% tras 134 ± 11 días desde su inoculación, siendo el inóculo que necesitaba un tiempo de incubación menor para inducir signos clínicos en animales. Por su parte, el inóculo Uap-CB, caracterizado como $\delta 1(-)$, causó una enfermedad priónica en cinco de los siete ratones inoculados tras 145 ± 14 días, mientras que los dos ratones restantes no presentaron signos clínicos tras 381 desde su inoculación. Esta potencial diferencia en los tiempos de incubación de los TgVole inoculados con Uap-CB podría indicar una mezcla de cepas o una tasa de ataque incompleta. Los encéfalos de los ratones que presentaron signos clínicos tras su inoculación con Cor-CB y Uap-CB fueron analizados por WB tras su digestión con PK. De nuevo se observaron algunas muestras en las que fue necesaria su concentración para la detección de PrP^{Sc}. En todas las muestras analizadas, tras su concentración de ser necesaria, se pudo apreciar PrP^{Sc} con un patrón electroforético clásico, con una mayor intensidad de señal en la banda correspondiente a la isoforma

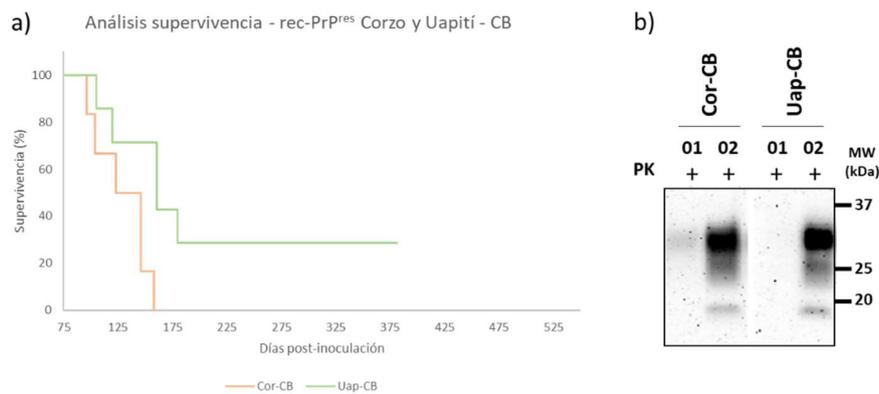


Figura 21. Estudio de la supervivencia y detección de PrP^{Sc} de los ratones TgVole inoculados con los confórmeros de corzo y uapití obtenidos por malplegamiento espontáneo en ausencia de cofactor.

a) Análisis de la supervivencia de los ratones TgVole inoculados con Cor-CB (rosa) y Uap-CB (verde) mediante su representación en curvas de supervivencia de Kaplan-Meier. Los grupos de ratones inoculados con los distintos confórmeros muestran, *a priori*, tiempos de incubación semejantes, aunque podría diferir en la tasa de ataque. Así, Cor-CB presenta los tiempos de incubación más cortos observados, con poca dispersión, mientras que Uap-CB, aunque aparentemente muestra tiempos de incubación cortos también, cuenta con dos animales del grupo sin signos clínicos, lo que se podría traducir en una gran dispersión o en una tasa de ataque incompleta. **b)** La mitad del encéfalo de los ratones TgVole que presentaron signos compatibles con una enfermedad priónica tras su inoculación fue homogeneizada y digerida con PK para la posterior detección de PrP^{Sc} mediante electroforesis y *Western blot*, utilizando para ello el anticuerpo D18 (1:5000). Este análisis permitió la detección de PrP^{Sc} en los encéfalos de los ratones inoculados con Uap-Dx-A y Uap-Dx-C, confirmando la infección priónica. Se observaron patrones de movilidad clásicos, algunos con concentración de PrP^{Sc} baja o indetectable sin concentración previa, tal y como se puede observar en las dos muestras representativas de cada inóculo mostradas. MW: Marcador de masa molecular.

RESULTADOS

diglicosilada de esta proteína. En la figura 21b se pueden observar dos muestras representativas para cada inóculo.

El estudio anatomopatológico de los encéfalos de los ratones inoculados con Cor-CB y Uap-CB mostraron, como era de esperar, perfiles lesionales muy diferentes entre sí (Figura 22a y 22d). En el caso de Cor-CB, se observaron cambios espongiiformes casi inapreciables en el cuerpo estriado y en la médula oblonga, concentrándose unos agregados de PrP^{Sc} muy sutiles principalmente en el mesencéfalo y en la médula oblonga, con una leve presencia también en el tálamo (Figura 22a). Estos depósitos de PrP^{Sc} presentaron un patrón punteado intraneuronal, como se puede observar en el mesencéfalo en la figura 22b y en la médula oblonga en la figura 22c. Finalmente, el inóculo Uap-CB produjo lesiones espongiiformes severas en numerosas áreas del cerebro de los ratones inoculados, siendo especialmente reseñables las del cuerpo estriado y las del hipocampo, con gliosis evidente en esta área (Figura 22d). Por su parte, los depósitos de PrP^{Sc} se observaron principalmente en el cuerpo estriado y en el hipocampo (Figura 22d), presentando patrones punteados (Figura 22e) y de agregados (Figura 22f).

Estos resultados histopatológicos indican que los dos inóculos obtenidos sin cofactor presentan características biológicas diferentes entre sí y distintas a los inóculos obtenidos con dextrano sulfatado, sugiriendo que son dos cepas diferentes. Estas diferencias son especialmente llamativas en el caso del inóculo Cor-CB, el cual presenta los segundos tiempos de incubación más cortos entre los grupos analizados y un perfil lesional único. Por su parte, Uap-CB podría presentar una tasa de ataque incompleta, lo que *a priori* la señalaría como una cepa diferente al resto, o dos tiempos de incubación diferentes dentro del mismo grupo de animales inoculados, lo que podría sugerir una mezcla de cepas. Sin embargo, su perfil lesional muestra características comunes con el de otros de los inóculos analizados, como Uap-Dx-C.

RESULTADOS

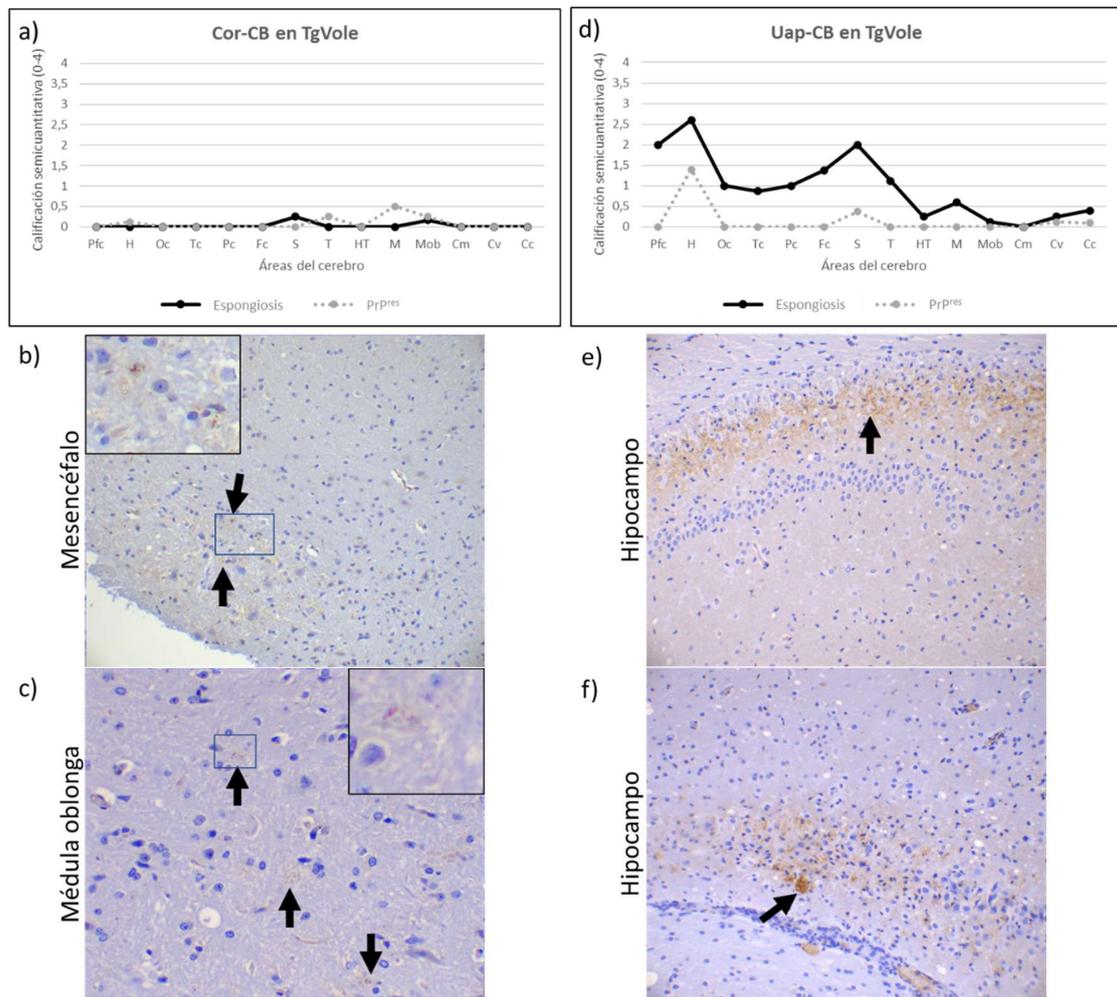


Figura 22. Perfil lesional de los ratones transgénicos TgVole inoculados con Cor-CB y Uap-CB y análisis histopatológico de sus encéfalos. Una de las mitades de los encéfalos de los TgVole inoculados con Cor-CB y Uap-CB fue fijada con paraformaldehído y embebida en parafina, para posteriormente realizar cortes que se destinaron a la tinción con hematoxilina-eosina (H/E) con el fin de evaluar lesiones espongiiformes y al estudio inmunohistoquímico para la detección de PrP^{Sc}, utilizando el anticuerpo 6C2 (1:1000). **a)** Perfil lesional de los TgVole inoculados con Cor-CB. Se observaron cambios espongiiformes casi inapreciables en el cuerpo estriado y en la médula oblonga, concentrándose unos agregados de PrP^{Sc} muy sutiles en el tálamo, **b)** en el mesencéfalo y **c)** en la médula oblonga. **d)** Perfil lesional de los TgVole inoculados con Uap-CB. Se observaron lesiones espongiiformes severas en numerosas áreas del cerebro, especialmente en el cuerpo estriado y el hipocampo. Los depósitos de PrP^{Sc} se observaron principalmente en el cuerpo estriado y en el hipocampo, presentando en esta área **e)** patrones punteados **f)** y de agregados. Pfc: córtex priforme, H: hipocampo, Oc: córtex occipital, Tc: córtex temporal, Pc: córtex parietal, Fc: córtex frontal, S: cuerpo estriado, T: tálamo, HT: hipotálamo, M: mesencéfalo, Mob: médula oblonga, Cm: núcleos cerebelares, Cv: vermis cerebelar, Cc: córtex cerebelar.

RESULTADOS

Si bien el conjunto de resultados obtenidos podría sugerir que los seis inóculos analizados en mayor profundidad (Cor-Dx-C, Cor-Dx-D, Uap-Dx-A, Uap-Dx-C, Cor-CB y Uap-CB) se corresponden con seis cepas diferentes, numerosos estudios indican que es necesario un mínimo de dos pases en animales para la estabilización de las cepas priónicas y, por tanto, para su correcta caracterización (Referencia). Es por ello por lo que, tras un único pase, no se podrían clasificar fehacientemente los diferentes confórmeros como cepas distintas, siendo necesario un segundo pase en el mismo modelo transgénico para poder extraer conclusiones definitivas. No obstante, esto pone también de manifiesto la falibilidad del panel de caracterización bioquímica utilizado, indicando que su resultado debe considerarse como una clasificación en potenciales cepas en función de algunas de sus propiedades más que de una determinación categórica de cepas como tales. Por último, los bioensayos indican sin lugar a duda la capacidad de los diferentes inóculos analizados de inducir una enfermedad priónica en modelos animales, lo que, junto con su resistencia parcial a la PK y su capacidad de propagarse indefinidamente, los erige como priones recombinantes *bona fide*.

5.- Efecto de los diferentes polimorfismos descritos en la PrP de cérvidos sobre su capacidad de malplegamiento espontáneo *in vitro*

La selección de los parámetros idóneos para la obtención *de novo* de semillas recombinantes de corzo y uapití mediante PMSA y su posterior caracterización *in vitro* tuvo como objetivo la sistematización de esta metodología para su aplicación en las distintas variantes polimórficas recombinantes de las PrP de cérvidos. Con esto se buscó evaluar el efecto de los polimorfismos presentes en dichas variantes tanto en el malplegamiento espontáneo como en los propios confórmeros de rec-PrP^{res} generados.

5.1.- Obtención de PrP recombinantes de cérvidos con sustituciones aminoacídicas

A través de un extenso estudio bibliográfico, se conoció la existencia de 47 variantes polimórficas de la proteína priónica en la familia *Cervidae*. En la figura 23 se puede observar cómo estas variantes surgen de la combinación de hasta 45 cambios aminoacídicos puntuales en 33 posiciones diferentes de la PrP de cérvido, considerando únicamente los polimorfismos descritos en la región de la proteína comprendida entre los residuos 90 y 233, la región clave en el evento del malplegamiento. Además de las 47 variantes descritas en la naturaleza, se consideraron 7 variantes artificiales para su estudio. Estas 7 PrP poseen un único polimorfismo puntual y son versiones derivadas de aquellas variantes descritas en la naturaleza que cuentan con más de un polimorfismo. Estas 7 variantes, las PrP con los polimorfismos M132L, A136V, P168S, V169M, Q171R, N173S y T177N, fueron diseñadas por el interés teórico que estos

RESULTADOS

cambios individuales suscitan, habiéndose descrito con otras variantes que ya están representadas entre el resto de las secuencias seleccionadas como variantes con cambios aminoacídicos puntuales:

- El polimorfismo M132L, únicamente descrito en uapití en comunión con el polimorfismo Q226E, confiere al animal una menor susceptibilidad a la infección con cepas norteamericanas de CWD (406) y cuando se encuentra en homocigosis puede dar lugar a una cepa priónica diferente (407).
- Los polimorfismos A136V y Q171R se corresponden con dos de los posibles cambios aminoacídicos presentes en los genotipos más estudiados de oveja (ARQ, VRQ, ARR). Estos cambios aparecen juntos en la variante polimórfica de cérvido T098S A136V Q171R, adoptando un genotipo que, extrapolado a oveja, no existiría en la naturaleza, VRR. Sin embargo, al generar las variantes simples se obtendrían los genotipos equivalentes a ARQ (PrP de cérvido sin cambios en las posiciones 136, 154, 171), VRQ (variante A136V) y ARR (variante Q171R), siendo el análisis comparativo de la PrP de cérvido con la PrP de oveja especialmente interesante tras los resultados obtenidos al estudiar la propagación *in vitro* de las semillas recombinantes de corzo y uapití en rec-PrP de dicha especie.

RESULTADOS

- Finalmente, el interés de los polimorfismos P168S, V169M, N173S y T177N reside en la región de la PrP en la que se encuentran, el giro β - α y sus alrededores, donde también se incluiría el cambio Q171R. La importancia de esta región de la PrP en el malplegamiento ha sido ampliamente descrita, especialmente las alteraciones en la barrera de transmisión interespecies derivada de su modificación (408).

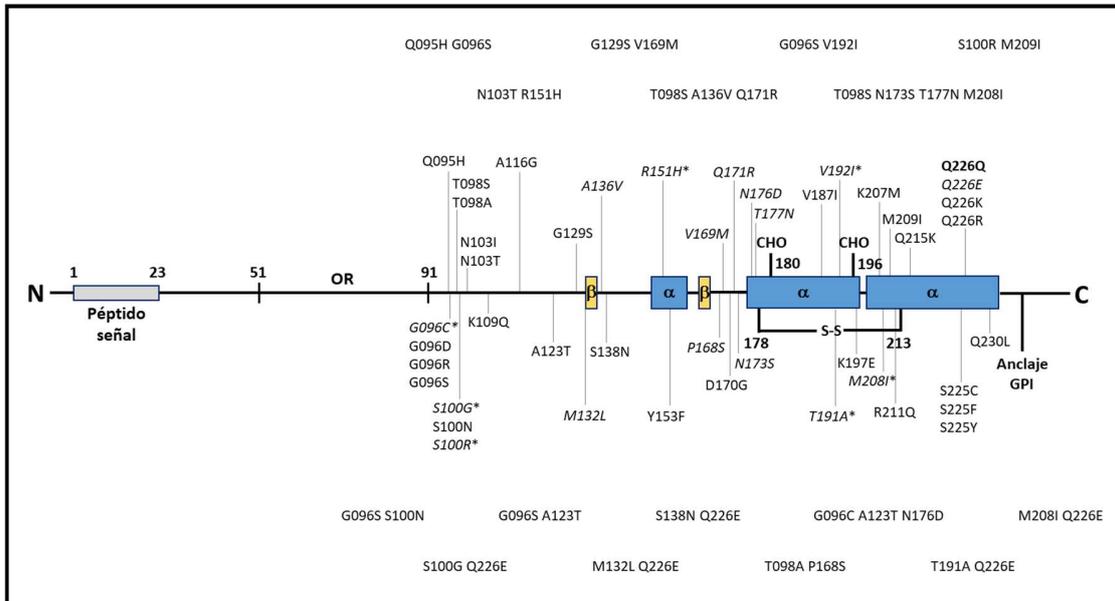


Figura 23. Representación gráfica de la PrP de corzo, con todos los polimorfismos descritos entre las posiciones 90 y 234 de las PrP de cérvidos. Todos los polimorfismos se han representado indicando el cambio aminoacídico frente a la secuencia de la PrP más frecuente en la familia *Cervidae*, la de corzo, resaltada en negrita. Las variantes polimórficas descritas con múltiples cambios aminoacídicos se han representado sobre y bajo la PrP. Las sustituciones aminoacídicas que forman parte de estas variantes polimórficas de cambios múltiples y no se han descrito de forma independiente en la naturaleza se han indicado en cursiva, añadiendo un asterisco a aquellas que no fueron incluidas en este estudio. Por el contrario, todos aquellos polimorfismos sin asterisco representan variantes polimórficas de las PrP de cérvido cuyas proteínas recombinantes equivalentes fueron producidas para su análisis.

Para la obtención de las 52 rec-PrP derivadas del estudio bibliográfico se recurrió a la síntesis génica del ORF de cada una de ellas, subclonados en el vector de expresión que se utilizó en el caso de las rec-PrP de corzo y uapití. Tras la cual se procedió a la transformación de los vectores de expresión en bacterias competentes, a la inducción de la producción de las diferentes PrP recombinantes y a su purificación.

5.2.- Malplegamiento espontáneo *in vitro* de las variantes polimórficas de las PrP recombinantes de cérvidos

RESULTADOS

Con el fin de evaluar el efecto de cada sustitución aminoacídica puntual o combinación de sustituciones aminoacídicas presentes en las variantes polimórficas de las PrP de cérvidos sobre el malplegamiento espontáneo, se diseñó un sistema de puntuación con el que cuantificar la tendencia a malplegar espontáneamente *in vitro*.

La tendencia al malplegamiento espontáneo *in vitro* se evaluó aplicando el mismo procedimiento de obtención de confórmeros recombinantes en presencia de cofactor mediante rondas seriadas de PMSA de 24 horas, cuyos parámetros idóneos fueron previamente seleccionados utilizando las rec-PrP de corzo y uapití. El resultado de cada ronda de PMSA se evaluó tras la digestión del producto obtenido con PK, seguido de una electroforesis y tinción de proteína total. Aquellas muestras positivas para rec-PrP^{res} se estabilizaron tras su adsorción en esferas de zirconio-sílice y posterior propagación seriada. Por el contrario, las muestras negativas se sometieron a rondas seriadas adicionales de PMSA hasta un máximo de 5 rondas (Figura 24a). Antes de realizar la primera ronda de PMSA, cada sustrato basado en rec-PrP de cérvidos se analizó por electroforesis y tinción de proteína total, sin digestión con PK, con el objetivo de comprobar que la concentración de rec-PrP de partida era similar en todos los casos y evitar así variaciones en el evento del malplegamiento espontáneo *in vitro* derivadas de concentraciones iniciales de rec-PrP diferentes. En la figura 24b se puede observar una muestra representativa de diferentes sustratos basados en variantes polimórficas de la rec-PrP de cérvido analizadas de esta manera, destacando la variante G096C A123T N176D por la baja concentración de rec-PrP presente en el sustrato. Esta baja concentración se debe al cambio aminoacídico G096C, siendo una característica del aminoácido cisteína la formación de puentes disulfuro con otras cisteínas. Esta característica se traduce en la creación de puentes disulfuro intermoleculares o alteraciones en el puente disulfuro intramolecular de la PrP que conllevan la agregación proteica y la pérdida de concentración de rec-PrP en el sustrato. Este mismo fenómeno se observó en la variante polimórfica S225C, impidiendo la evaluación de la tendencia al malplegamiento espontáneo *in vitro* de ambas. Aunque se valoró la posibilidad de añadir un agente reductor para solventar este inconveniente, las variaciones introducidas en el sistema por este agente sugirieron la retirada de ambas variantes polimórficas del estudio final. No obstante, la tendencia al malplegamiento espontáneo *in vitro* del resto de variantes polimórficas sí pudo ser analizada, mostrándose en la figura 24c dos ejemplos. En el primer ejemplo, el de la rec-PrP M132L, se puede observar cómo las cuatro réplicas técnicas sometidas al procedimiento de malplegamiento espontáneo mostraron presencia de rec-PrP^{res} en el análisis por digestión con PK, electroforesis y tinción de proteína total tras la primera ronda de PMSA, apreciándose diferencias en el patrón electroforético de uno de los confórmeros obtenidos con respecto al resto. En el segundo ejemplo, en cambio, se observa cómo la rec-

RESULTADOS

PrP S225F requiere de tres rondas seriadas de PMSA para que las cuatro réplicas técnicas presenten rec-PrP^{res} en el análisis por digestión con PK, electroforesis y tinción de proteína total, observándose el mismo patrón electroforético en todas las réplicas independientemente de la ronda de PMSA en la que se hubiera formado el confórmero.

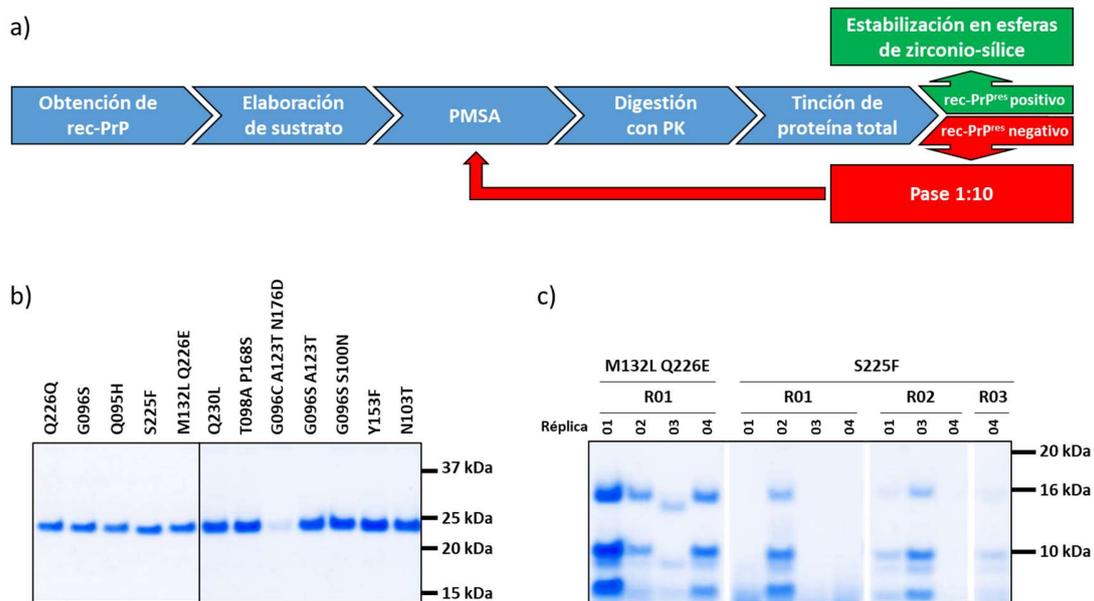


Figura 24. Protocolo de obtención de confórmeros recombinantes malplegados espontáneamente *in vitro* en presencia de dextrano a partir de las variantes polimórficas de las PrP de cérvidos. **a)** Flujo de trabajo esquemático del proceso de obtención de semillas recombinantes de cérvido, desde la obtención de la rec-PrP hasta la estabilización y adsorción a esferas de zirconio-sílice del confórmero *per se*. **b)** Visualización de una muestra representativa de los sustratos preparados con PrP recombinantes de cérvidos con diferentes polimorfismos. Con el objetivo de confirmar que la concentración inicial de rec-PrP en todos los sustratos era la misma, todos ellos se analizaron mediante electroforesis y tinción de proteína total sin digerir con PK. A excepción de los sustratos con rec-PrP G069C A123T N176D y S225C, el resto presentó una cantidad similar de rec-PrP. La menor cantidad de rec-PrP observada en los sustratos con las variantes polimórficas indicadas se debe a la presencia adicional de un aminoácido cisteína, cuyas propiedades suponen la creación de puentes disulfuro intermoleculares o alteraciones en el puente disulfuro intramolecular de la PrP que conllevan la agregación proteica y la pérdida de concentración de rec-PrP en el sustrato. Por este motivo, las rec-PrP con cisteínas adicionales fueron excluidas del estudio. **c)** Visualización de una muestra representativa de los confórmeros obtenidos por malplegamiento espontáneo *in vitro* de las rec-PrP de cérvidos con diferentes polimorfismos. Mediante un sistema de rondas seriadas de PMSA de 24 horas cada una en presencia de esferas de vidrio, se llevó a cabo el malplegamiento espontáneo de las distintas rec-PrP de cérvidos analizadas, incluyendo cuatro réplicas técnicas por variante polimórfica. Se puede observar cómo, tras analizar el producto de las rondas seriadas mediante digestión con PK, electroforesis y tinción de proteína total, las diferentes variantes polimórficas presentaron tendencias al malplegamiento espontáneo distintas, viéndose esto reflejado en el número de rondas seriadas necesarias para obtener rec-PrP^{res} en las cuatro réplicas técnicas. Además, como se puede observar con la réplica técnica 03 de la variante M132L Q226E, este sistema permite la obtención de confórmeros con patrones electroforéticos distintos a partir de la misma rec-PrP. R01: ronda de PMSA 01. R02: ronda de PMSA 02. R03: ronda de PMSA 03.

RESULTADOS

Es esta obtención de rec-PrP^{res} en diferentes rondas en función de la secuencia aminoacídica de la rec-PrP presente en el sustrato la que permite establecer una valoración semicuantitativa de la tendencia al malplegamiento espontáneo *in vitro* de cada variante polimórfica de PrP de cérvido analizada. El sistema de puntuación se diseñó fundamentándose en el número de ronda de PMSA tras el cual las réplicas técnicas de cada variante polimórfica presentan rec-PrP^{res} detectable por digestión con PK, electroforesis y tinción de proteína total. De este modo, cuando una réplica técnica era rec-PrP^{res} positiva tras la primera ronda, recibía una puntuación de 5, tras la segunda ronda, 4 puntos, tras la tercera, 3 puntos, y así sucesivamente hasta la quinta ronda, en la que recibía 1 punto si era rec-PrP^{res} positiva o 0 puntos si era rec-PrP^{res} negativa. Ahora bien, cuando una réplica técnica era rec-PrP^{res} positiva tras la primera ronda de PMSA, esta no sólo recibía los 5 puntos de esa ronda, si no que se le sumaban los puntos de las rondas posteriores, alcanzando un total de 15 puntos. De igual forma, una réplica técnica rec-PrP^{res} positiva tras la segunda ronda sumaba un total de 10 puntos, tras la tercera ronda, 6 puntos, etc. Así, tras sumar la puntuación de cada una de las cuatro réplicas técnicas representativas de cada variante polimórfica y normalizar el resultado sobre 100, se obtuvo el valor cuantitativo de la tendencia al malplegamiento espontáneo *in vitro* de cada variante polimórfica analizada. Utilizando los ejemplos de la figura 24c, la cuantificación de la tendencia al malplegamiento espontáneo *in vitro* de la rec-PrP de cérvido con el polimorfismo M132L Q226E sería del 100%, ya que las cuatro réplicas técnicas fueron rec-PrP^{res} positivas tras la primera ronda de PMSA, mientras que la de la rec-PrP de cérvido con el polimorfismo S225F, sería de 68,3%, ya que tras la primera ronda solo una réplica técnica fue rec-PrP^{res} positiva, después de la segunda hubo dos más y, únicamente al analizar el resultado de la tercera ronda, se detectó rec-PrP^{res} positiva en la cuarta réplica.

Este sistema de evaluación por puntos de la tendencia al malplegamiento espontáneo *in vitro* se aplicó a todas las variantes polimórficas de las PrP de cérvidos analizadas, recogiendo el resultado en la figura 25. En ella puede observarse cómo es especialmente crítica la región del giro β 2- α 2 y sus alrededores, donde la gran mayoría de cambios aminoacídicos se traducen en una tendencia menor al malplegamiento espontáneo *in vitro* o, en otras palabras, en una mayor resistencia al malplegamiento, siendo el máximo exponente de esa resistencia la variante T098S A136V Q171R. También aparece una cierta resistencia al malplegamiento espontáneo *in vitro*, aunque mucho menos acusada, cuando se introducen cambios en la secuencia en la región C-terminal. Por último, caben destacar dos fenómenos contrarios. Por una parte, se puede apreciar cómo algunas variantes polimórficas con un cambio aminoacídico puntual tienen un pronunciado efecto en la tendencia al malplegamiento espontáneo *in vitro*, el cual desaparece cuando dicho cambio aminoacídico coexiste con otro, como es el caso de la

RESULTADOS

variante M132L en comparación con la variante M132L Q226E. Por otra parte, se puede observar el efecto opuesto, en el que una variante polimórfica con varios cambios aminoacídicos presenta una baja tendencia al malplegamiento espontáneo *in vitro*, mientras que las variantes polimórficas que presentan cada uno de esos cambios de forma individual se caracterizan por una alta tendencia a este malplegamiento, como es el caso de la variante polimórfica G096S A123T frente a las variantes G096S y A123T. Esto es indicativo de que el efecto de las variaciones polimórficas como consecuencia de múltiples cambios aminoacídicos es complejo, probablemente debido a efectos distales y a que los datos obtenidos de las variaciones puntuales no pueden extrapolarse al observado cuando estas coexisten con otras.

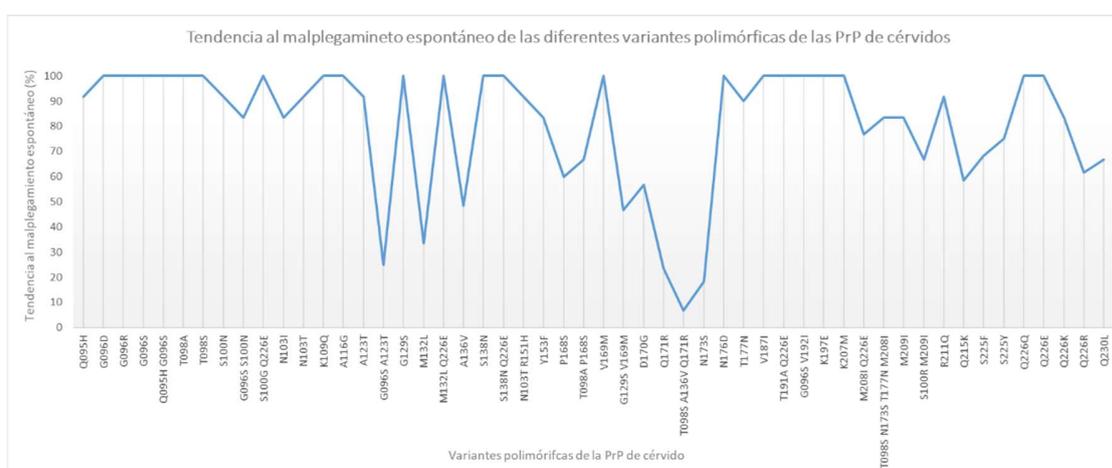


Figura 25. Tendencia al malplegamiento espontáneo de las diferentes variantes polimórficas de las PrP de cérvidos. Tras analizar mediante digestión con PK, electroforesis y tinción de proteína total el resultado de hasta cinco rondas seriadas de PMSA, se evaluó la tendencia al malplegamiento espontáneo de cada variante polimórfica de las PrP de cérvidos. Esta evaluación se llevó a cabo mediante una puntuación basada en la fórmula $Tme = (n_{R01} * 5) + (n_{R02} * 4) + (n_{R03} * 3) + (n_{R04} * 2) + (n_{R01} * 1)$, donde Tme es la tendencia al malplegamiento espontáneo, n_{R01} es el número de réplicas técnicas positivas para rec-PrP^{res} tras la ronda 01 de PMSA, n_{R02} , el número de réplicas técnicas positivas para rec-PrP^{res} tras la ronda 02 de PMSA, y así sucesivamente hasta la ronda 05. Cabe señalar que toda réplica técnica positiva para rec-PrP^{res} tras la ronda 01 de PMSA lo será también para las rondas sucesivas. Los resultados de aplicar esta fórmula con cada variante polimórfica analizada se representaron en forma de porcentaje. En la gráfica se pueden observar las diferentes variantes polimórficas en el eje de abscisas, colocadas según su posición en la PrP, de más N-terminal a más C-terminal. Así, puede apreciarse una tendencia al malplegamiento espontáneo especialmente reducida en las variantes polimórficas con cambios aminoacídicos en la región del giro $\beta 2$ - $\alpha 2$ y sus alrededores (aminoácidos 168 a 173). También se puede observar una menor tendencia al malplegamiento espontáneo cuando se introducen cambios en la secuencia en la región C-terminal y en algunas variantes polimórficas con cambios aminoacídicos entre los aminoácidos 120 y 140.

Así, los resultados expuestos permiten detectar regiones de la PrP en la que la introducción de cambios aminoacídicos podría alterar en mayor (giro $\beta 2$ - $\alpha 2$) o menor medida (extremo C-terminal) la

RESULTADOS

tendencia de la misma al malplegamiento espontáneo, demostrando además la importancia aparente de la interacción entre aminoácidos de diferentes regiones en este evento.

5.3.- Caracterización bioquímica de las variantes polimórficas de las PrP recombinantes de cérvidos malplegadas espontáneamente *in vitro*

Tal y como se observó con las semillas recombinantes de corzo y uapití obtenidas por malplegamiento espontáneo mediante PMSA, los confórmeros generados utilizando esta técnica pueden presentar características bioquímicas diferentes entre sí. Así, del mismo modo que se clasificaron las semillas recombinantes de corzo y uapití en distintas potenciales cepas en función de sus características bioquímicas y utilizando el mismo panel de pruebas diseñado para tal fin, se llevó a cabo la caracterización de los confórmeros resultantes del análisis de la tendencia al malplegamiento espontáneo *in vitro* de cada variante polimórfica de las PrP de cérvidos. No obstante, cabe señalar que se seleccionaron únicamente rec-PrP^{res} de dos de las cuatro réplicas técnicas utilizadas en el experimento anterior, las cuales fueron estabilizadas y adsorbidas en esferas de zirconio-sílice, el paso previo a la caracterización bioquímica. La selección de dos rec-PrP^{res} por cada variante polimórfica se consideró suficiente con el fin de abarcar la variabilidad observada previamente a través de los patrones de movilidad electroforética, teniendo en cuenta que el máximo de patrones distintos detectados en una misma variante fue de dos. Esta selección se realizó también con el objetivo de cubrir cepas potencialmente diferentes en aquellas variantes en las que solo se detectó un único patrón de movilidad tras estudiar todas las réplicas, contemplando la posibilidad de que dos muestras con un mismo patrón bioquímico pudieran presentar propiedades diferentes. Sin embargo, durante esa selección se detectaron algunos patrones electroforéticos especialmente característicos y similares entre sí en los confórmeros seleccionados de dos variantes polimórficas, la S100R M209I y la T098S A136V Q171R. Estos patrones de características inusuales, compuestos por múltiples bandas de masas moleculares distribuidas desde ~25 kDa hasta ~2 kDa, habían sido previamente observados en experimentos de malplegamiento espontáneo con rec-PrP de otras especies mediante PMSA. Esto ocurría especialmente cuando las rec-PrP sometidas al procedimiento presentaban una cierta resistencia al malplegamiento espontáneo. En esos experimentos se descubrió que el malplegamiento que daba lugar a estos patrones electroforéticos no se correspondían con el de los priones *bona fide*, ya que la proteína resultante del proceso era completamente degradada al aumentar levemente la concentración de PK con la que se llevaba a cabo la digestión. Así pues, se replicó ese ensayo de resistencia a PK, digiriendo los confórmeros de las variantes polimórficas S100R M209I y T098S A136V Q171R con 25, 50 y 100 µg/ml de PK y analizando el resultado por electroforesis y tinción de proteína

RESULTADOS

total, con el objetivo de determinar si estos patrones inusuales podrían corresponder a agregados sin las características propias de los priones *bona fide*. El resultado de este ensayo se puede observar en la figura 26, donde se aprecia cómo al digerir los confórmers con 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PK el patrón electroforético es el de múltiples bandas, mientras que al aumentar la concentración de proteinasa aparecen dos escenarios distintos. Por una parte, los confórmers de la variante S100R M209I muestran un patrón electroforético usual entre las semillas recombinantes de cérvido analizadas hasta el momento, el patrón electroforético β (Figura 26a). Por otra parte, el único confórmer obtenido por malplegamiento espontáneo *in vitro* de la variante polimórfica T098S A136V Q171R pierde la mayoría de las bandas características de su patrón electroforético al ser digerido con 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PK y se degrada completamente al ser digerido con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PK (Figura 26b). De este modo se confirma que el confórmer de la variante T098S A136V Q171R no se corresponde con una semilla recombinante resistente a PK, sino a algún otro tipo de agregado, posiblemente amorfo, por lo que no se incluyó en el estudio de caracterización bioquímica. Por el contrario, los confórmers seleccionados de la variante polimórfica S100R M209I están constituidos por una mezcla de agregados amorfos no resistentes a PK y rec-PrP^{res}, siendo el patrón electroforético de esta última el considerado para su posterior caracterización bioquímica.

RESULTADOS

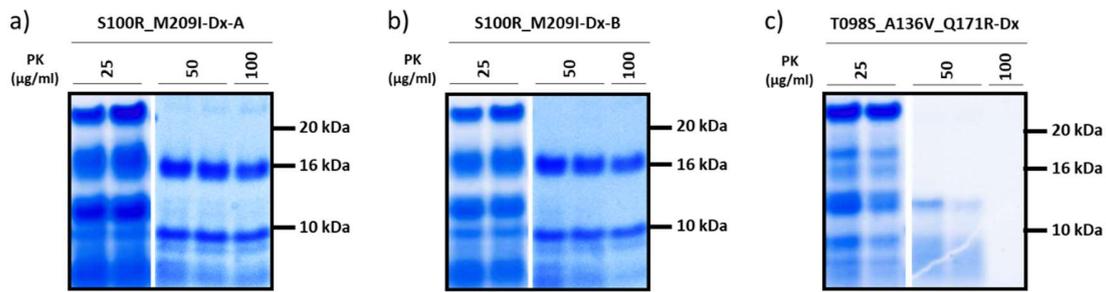


Figura 26. Ensayo de resistencia a la digestión con PK de confórmers con patrones electroforéticos de características inusuales obtenidos por malplegamiento espontáneo *in vitro* de las variantes polimórficas de las PrP de cérvidos. **a)** Electroforesis y tinción de proteína total del producto de la digestión del confórmero S100R_M209I-Dx-A con concentraciones crecientes de PK (25, 50, y 100 µg/ml). Aunque al digerir la muestra con 25 µg/ml de PK se detectó un patrón electroforético con múltiples bandas y muy diferente al observado en priones recombinantes *bona fide*, al aumentar las concentraciones se obtuvieron patrones electroforéticos estándares, concretamente el patrón β . **b)** Electroforesis y tinción de proteína total del producto de la digestión del confórmero S100R_M209I-Dx-B con concentraciones crecientes de PK (25, 50, y 100 µg/ml). De nuevo, la digestión de la muestra con 25 µg/ml de PK produjo un patrón inusual que desapareció al aumentar la concentración de proteinasa, obteniéndose el patrón β . **c)** Electroforesis y tinción de proteína total del producto de la digestión del confórmero T098S_A136V_Q171R-Dx con concentraciones crecientes de PK (25, 50, y 100 µg/ml). El patrón de digestión con múltiples bandas observado al digerir la muestra con 25 µg/ml de PK se degradó en su mayoría al ser digerido con 50 µg/ml de proteinasa, observándose una banda de ~12 kDa y una banda difusa por debajo de ~9 kDa. Estas bandas desaparecen completamente al digerir la muestra con 100 µg/ml de PK, indicando que el confórmero T098S_A136V_Q171R-Dx no está compuesto de rec-PrP^{res}, si no de algún tipo de agregado diferente. Por otro lado, los confórmers S100R_M209I-Dx-A y S100R_M209I-Dx-B estarían constituidos por una mezcla de agregados no resistentes a PK y rec-PrP^{res}.

Una vez finalizada la selección de confórmers a caracterizar, se llevó a cabo su estabilización y adsorción en esferas de zirconio-sílice siguiendo el procedimiento utilizado con las rec-PrP^{res} de corzo y uapití. A continuación, el producto de esta estabilización se sometió al conjunto de pruebas *in vitro* que constituyen el panel de caracterización bioquímica.

El primero de los criterios de dicho panel, el patrón electroforético de las diferentes semillas recombinantes, analizado tras la digestión con PK seguido de electroforesis y tinción de proteína total, permitió distinguir 11 nuevos patrones electroforéticos, sugiriendo un esperado incremento de la variedad de cepas potenciales como consecuencia de las diferencias en las secuencias aminoacídicas. Estos están incluidos en la figura 27, mostrando la figura 27a la imagen de un confórmero representativo de cada patrón observado y la figura 27b una representación gráfica de cada uno de estos patrones asociándolo con una letra del alfabeto griego. En esta figura se han incluido también, aunque diferenciándolos del resto, los patrones electroforéticos observados en los confórmers de las variantes polimórficas S100R M209I y T098S A136V Q171R, a pesar de haber demostrado que este último se

RESULTADOS

corresponde con un agregado amorfo no resistente a PK y que el primero es una mezcla del patrón electroforético de dicho agregado y de una semilla recombinante con malplegamiento *bona fide*.

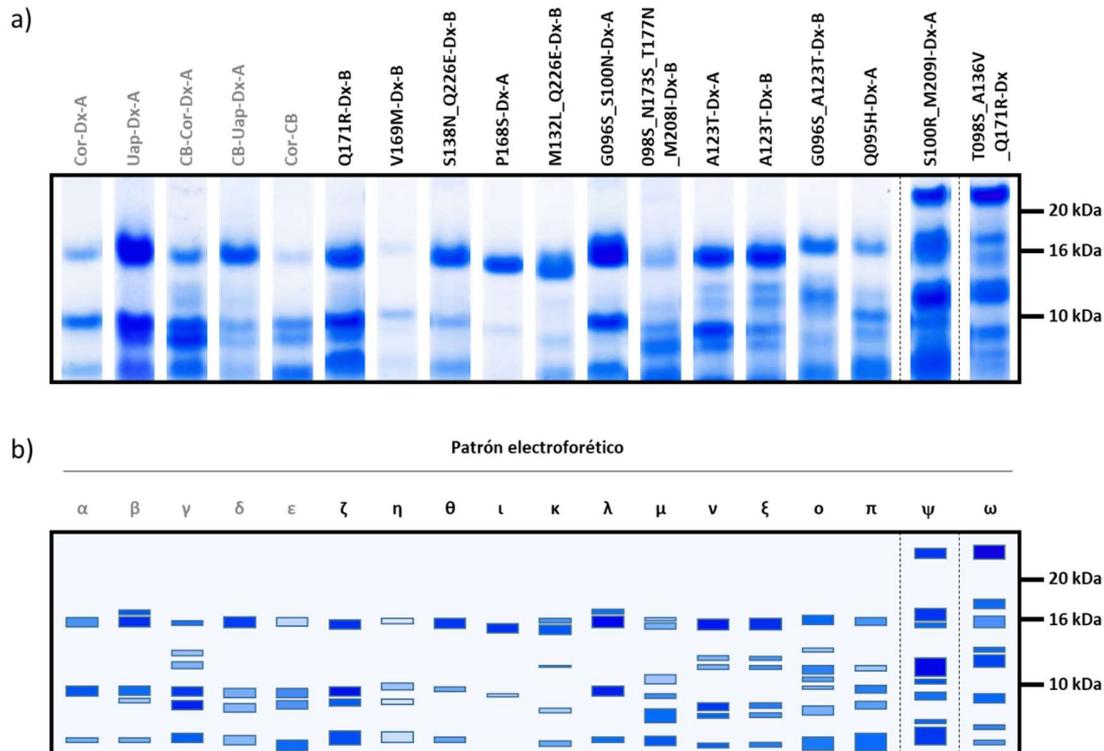


Figura 27. Patrones de movilidad electroforética observados en las semillas recombinantes obtenidas por malplegamiento espontáneo *in vitro* de las variantes polimórficas de las PrP^{res} de cérvidos. a) Electroforesis y tinción de proteína total de una rec-PrP^{res} de cérvido representativa para cada patrón electroforético diferente observado. **b)** Representación gráfica de los diferentes patrones de movilidad electroforética observados entre las rec-PrP^{res} de cérvido analizadas. La representación gráfica de cada patrón electroforético se muestra bajo la imagen de electroforesis y tinción de proteína total de la rec-PrP^{res} de cérvido representativa de cada uno de estos patrones. Se puede observar en gris el nombre de los confórmers y la letra griega asignados a los patrones electroforéticos que ya han sido descritos en apartados anteriores. Los patrones electroforéticos ψ y ω , correspondientes al producto de digestión con PK a 25 $\mu\text{g/ml}$ de concentración de los confórmers S100R_M209I-Dx-A y T098S_A136V_Q171R-Dx, se han separado del resto mediante líneas discontinuas y se le han asignado las últimas letras del alfabeto griego debido su susceptibilidad a la digestión con cantidades mayores de PK y, por tanto, a no ser potenciales priones recombinantes *bona fide*.

Finalmente, el resumen de la caracterización, indicándose la cepa potencial correspondiente a cada confórmero analizado, se muestra en las tablas 4, 5 y 6. Cada una de estas tablas recoge la información sobre la caracterización bioquímica de las semillas recombinantes de las diferentes variantes polimórficas, organizadas de tal manera que la tabla 4 muestra aquellas variantes cuyos cambios aminoacídicos con respecto a la PrP de corzo se localizan entre los aminoácidos 90 y 131 (región flexible N- terminal), la tabla 5 recoge las variantes con polimorfismos localizados entre los residuos 132 y 197 (región central de la proteína que incluye las lámina β 1 y 2 y las hélice α 1 y 2) y la tabla 6 incluye las

RESULTADOS

variantes polimórficas con cambios localizados entre las posiciones 198 y 233 (hélice α 3 y extremo C-terminal). En estas tablas se puede observar cómo los 108 confórmeros caracterizados han sido clasificados como 24 cepas potenciales distintas. Al analizarse por separado cada una de las características bioquímicas observadas entre las cepas potenciales, las más comunes fueron los patrones electroforéticos α y β , siendo más usual el patrón de tipo α , la ausencia de barrera de transmisión al propagar *in vitro* en sustrato basado en rec-PrP de oveja con genotipo ARQ, y la incapacidad de ser detectadas por el anticuerpo 12B2, dando lugar su combinación a la cepa potencial $\alpha 0(-)$, la más frecuente entre las rec-PrP^{res} de las variantes polimórficas de la PrP de cévido malplegadas espontáneamente por PMSA y la cepa potencial mayoritaria entre las semillas recombinantes de corzo. Cabe destacar que los resultados sugieren que no hay una relación de necesidad entre las tres características bioquímicas analizadas, es decir, un patrón concreto en una cepa potencial no implica la ausencia o presencia de barrera de transmisión a oveja ARQ ni su capacidad o incapacidad de ser detectada con 12B2, al menos en los casos más comunes. Los resultados obtenidos reflejan también la utilidad del panel de caracterización desarrollado que, aunque limitado a tres propiedades bioquímicas por la necesidad de aplicarlo a una gran cantidad de muestras, ha permitido la distinción entre confórmeros con un mismo patrón de movilidad electroforética, pero con características de cepas potencialmente diferentes, como en los casos de las variantes K109Q, A116G, Y153F o K197E. Asimismo, la simplicidad de la caracterización realizada permite teorizar la existencia de variantes que pudieran restringir la variedad conformacional, frente a otras que podrían promoverla, observándose multitud de variantes en las que no se detectaron confórmeros potencialmente distintos en ninguna réplica y otras que dieron lugar a confórmeros no solo distintos de los obtenidos con el corzo y uapití, sino también completamente diferentes entre sí. El elevado número de potenciales cepas diferenciadas entre confórmeros obtenidos por malplegamiento espontáneo *in vitro* de variantes polimórficas recombinantes de la PrP de cévido pone en evidencia el gran efecto en la formación de nuevas cepas producidos por pequeños cambios en la secuencia aminoacídica.

RESULTADOS

Tabla 4. Caracterización bioquímica *in vitro* de los confórmers obtenidos por malplegamiento espontáneo mediante PMSA de las variantes polimórficas de las PrP de cérvidos cuyos cambios aminoacídicos se localizan entre los residuos 90 y 131 de la PrP.

Variante	Confórmers seleccionados	Potencial cepa
Q095H	Q095H-Dx-A	$\pi 0(-)$
	Q095H-Dx-B	$\theta 0(-)$
G096D	G096D-Dx-A	$\beta 0(-)$
	G096D-Dx-B	$\alpha 0(-)$
G096R	G096R-Dx-A	$\alpha 0(-)$
	G096R-Dx-B	$\beta 0(-)$
G096S	G096S-Dx-A	$\beta 0(-)$
	G096S-Dx-B	$\alpha 0(-)$
Q095H G096S	Q095H_G096S-Dx-A	$\alpha 0(+)$
	Q095H_G096S-Dx-B	$\beta 0(-)$
T098A	T098A-Dx-A	$\beta 0(+)$
	T098A-Dx-B	$\alpha 0(+)$
T098S	T098S-Dx-A	$\alpha 0(+)$
	T098S-Dx-B	$\alpha 0(+)$
S100N	S100N-Dx-A	$\beta 0(-)$
	S100N-Dx-B	$\beta 0(-)$
G096S S100N	G096S_S100N-Dx-A	$\lambda 0(+)$
	G096S_S100N-Dx-B	$\lambda 0(+)$
S100G Q226E	S100G_Q226E-Dx-A	$\beta 0(+)$
	S100G_Q226E-Dx-B	$\beta 0(+)$
N103I	N103I-Dx-A	$\beta 0(-)$
	N103I-Dx-B	$\alpha 0(-)$
N103T	N103T-Dx-A	$\alpha 0(-)$
	N103T-Dx-B	$\alpha 0(-)$
K109Q	K109Q-Dx-A	$\alpha 0(-)$
	K109Q-Dx-B	$\alpha 0(+)$
A116G	A116G-Dx-A	$\alpha 0(-)$
	A116G-Dx-B	$\alpha 0(+)$
A123T	A123T-Dx-A	$\nu 1(-)$
	A123T-Dx-B	$\xi 1(-)$
G096S A123T	G096S_A123T-Dx-A	$\nu 1(-)$
	G096S_A123T-Dx-B	$\sigma 1(-)$
G129S	G129S-Dx-A	$\alpha 0(-)$
	G129S-Dx-B	$\alpha 0(-)$

Cada confórmero se clasificó como una potencial cepa en función de las propiedades bioquímicas evaluadas mediante el panel de caracterización. El nombre de cada potencial cepa se compone de tres caracteres que resumen las siguientes propiedades de cada confórmero:

- La letra del alfabeto griego representa el patrón electroforético presentado por el confórmero.
- Los valores numéricos 0 o 1 hacen referencia a la ausencia o presencia de barrera de transmisión a oveja ARQ, respectivamente.
- El signo positivo, (+), o negativo, (-), se correlaciona con la capacidad del confórmero de ser detectado o no, respectivamente, por el anticuerpo 12B2.

Se puede observar cómo las propiedades bioquímicas más frecuentes entre los confórmers incluidos en esta tabla son los patrones electroforéticos α y β , la ausencia de barrera de transmisión a rec-PrP de oveja con genotipo ARQ y la incapacidad de ser detectados por el anticuerpo 12B2.

RESULTADOS

Tabla 5. Caracterización bioquímica *in vitro* de los confórmers obtenidos por malplegamiento espontáneo mediante PMSA de las variantes polimórficas de las PrP de cérvidos cuyos cambios aminoacídicos se localizan entre los residuos 132 y 197 de la PrP.

Variante	Confórmers seleccionados	Potencial cepa
M132L	M132L-Dx-A	$\beta 1(-)$
	M132L-Dx-B	$\beta 1(-)$
M132L Q226E	M132L_Q226E-Dx-A	$\beta 0(+)$
	M132L_Q226E-Dx-B	$\kappa 0(-)$
A136V	A136V-Dx-A	$\nu 0(+)$
	A136V-Dx-B	$\nu 1(-)$
S138N	S138N-Dx-A	$\beta 0(+)$
	S138N-Dx-B	$\beta 0(+)$
S138N Q226E	S138N_Q226E-Dx-A	$\alpha 0(-)$
	S138N_Q226E-Dx-B	$\theta 1(-)$
N103T R151H	N103T_R151H-Dx-A	$\theta 0(-)$
	N103T_R151H-Dx-B	$\theta 0(-)$
Y153F	Y153F-Dx-A	$\alpha 0(+)$
	Y153F-Dx-B	$\alpha 0(-)$
P168S	P168S-Dx-A	$\iota 1(-)$
	P168S-Dx-B	$\iota 1(-)$
T098A P168S	T098A_P168S-Dx-A	$\alpha 0(-)$
	T098A_P168S-Dx-B	$\iota 1(-)$
V169M	V169M-Dx-A	$\epsilon 1(-)$
	V169M-Dx-B	$\eta 1(-)$
G129S V169M	G129S_V169M-Dx-A	$\pi 0(-)$
	G129S_V169M-Dx-B	$\epsilon 1(-)$
D170G	D170G-Dx-A	$\alpha 1(-)$
	D170G-Dx-B	$\alpha 1(-)$
Q171R	Q171R-Dx-A	$\iota 0(-)$
	Q171R-Dx-B	$\zeta 1(-)$
N173S	N173S-Dx-A	$\beta 0(-)$
	N173S-Dx-B	$\zeta 1(-)$
N176D	N176D-Dx-A	$\alpha 1(+)$
	N176D-Dx-B	$\beta 1(-)$
T177N	T177N-Dx-A	$\zeta 0(-)$
	T177N-Dx-B	$\alpha 1(-)$
V187I	V187I-Dx-A	$\alpha 1(-)$
	V187I-Dx-B	$\zeta 1(-)$
T191A Q226E	T191A_Q226E-Dx-A	$\alpha 0(+)$
	T191A_Q226E-Dx-B	$\beta 0(-)$
G096S V192I	G096S_V192I-Dx-A	$\alpha 0(-)$
	G096S_V192I-Dx-B	$\alpha 0(-)$
K197E	K197E-Dx-A	$\alpha 0(+)$
	K197E-Dx-B	$\alpha 1(-)$

Cada confórmer se clasificó como una potencial cepa en función de las propiedades bioquímicas evaluadas mediante el panel de caracterización. El nombre de cada potencial cepa se compone de tres caracteres que resumen las siguientes propiedades de cada confórmer:

- La letra del alfabeto griego representa el patrón electroforético presentado por el confórmer.
- Los valores numéricos 0 o 1 hacen referencia a la ausencia o presencia de barrera de transmisión a oveja ARQ, respectivamente.
- El signo positivo, (+), o negativo, (-), se correlaciona con la capacidad del confórmer de ser detectado o no, respectivamente, por el anticuerpo 12B2.

Entre los confórmers incluidos en esta tabla se observa una elevada variedad entre las propiedades bioquímicas analizadas, sugiriendo una mayor importancia de los residuos de la zona central de la PrP en la generación de nuevas cepas.

RESULTADOS

Tabla 6. Caracterización bioquímica *in vitro* de los confórmeros obtenidos por malplegamiento espontáneo mediante PMSA de las variantes polimórficas de las PrP de cérvidos cuyos cambios aminoacídicos se localizan entre los residuos 198 y 234 de la PrP.

Variante	Confórmeros seleccionados	Potencial cepa
K207M	K207M-Dx-A	$\zeta 1(-)$
	K207M-Dx-B	$\alpha 0(-)$
M208I Q226E	M208I_Q226E-Dx-A	$\zeta 1(-)$
	M208I_Q226E-Dx-B	$\alpha 0(+)$
T098S N173S T177N M208I	T098S_N173S_T177N_M208I-Dx-A	$\alpha 0(+)$
	T098S_N173S_T177N_M208I-Dx-B	$\mu 0(-)$
M209I	M209I-Dx-A	$\beta 0(-)$
	M209I-Dx-B	$\beta 0(-)$
S100R M209I	S100R_M209I-Dx-A	$\beta 0(-)$
	S100R_M209I-Dx-B	$\beta 0(+)$
R211Q	R211Q-Dx-A	$\beta 1(+)$
	R211Q-Dx-B	$\alpha 1(-)$
Q215K	Q215K-Dx-A	$\beta 1(-)$
	Q215K-Dx-B	$\beta 1(-)$
S225F	S225F-Dx-A	$\zeta 1(-)$
	S225F-Dx-B	$\zeta 1(-)$
S225Y	S225Y-Dx-A	$\nu 1(-)$
	S225Y-Dx-B	$\xi 1(-)$
Q226Q	Cor-Dx-A	$\alpha 0(-)$
	Cor-Dx-B	$\alpha 0(-)$
	Cor-Dx-C	$\alpha 0(-)$
	Cor-Dx-D	$\beta 1(+)$
Q226E	Uap-Dx-A	$\beta 1(+)$
	Uap-Dx-B	$\beta 1(+)$
	Uap-Dx-C	$\beta 1(+)$
	Uap-Dx-D	$\beta 1(+)$
Q226K	Q226K-Dx-A	$\alpha 1(-)$
	Q226K-Dx-B	$\beta 0(-)$
Q226R	Q226R-Dx-A	$\zeta 0(-)$
	Q226R-Dx-B	$\alpha 0(-)$
Q230L	Q230L-Dx-A	$\alpha 0(-)$
	Q230L-Dx-B	$\beta 1(+)$

Cada confórmero se clasificó como una potencial cepa en función de las propiedades bioquímicas evaluadas mediante el panel de caracterización. El nombre de cada potencial cepa se compone de tres caracteres que resumen las siguientes propiedades de cada confórmero:

- La letra del alfabeto griego representa el patrón electroforético presentado por el confórmero.
- Los valores numéricos 0 o 1 hacen referencia a la ausencia o presencia de barrera de transmisión a oveja ARQ, respectivamente.
- El signo positivo, (+), o negativo, (-), se correlaciona con la capacidad del confórmero de ser detectado o no, respectivamente, por el anticuerpo 12B2.

De nuevo se observa una elevada variabilidad entre las potenciales cepas descritas en los confórmeros incluidos en esta tabla, sugiriendo un efecto importante del extremo C- terminal en la generación de nuevas cepas. Se han marcado en gris los confórmeros de corzo y uapití, caracterizados previamente.

RESULTADOS

6.- Relevancia del residuo 226 en las características de las PrP recombinantes de cérvidos malplegadas espontáneamente *in vitro*

La metodología *in vitro* utilizada ha permitido evaluar tanto el efecto de cada uno de los polimorfismos de las PrP de cérvido en la tendencia a malplegar espontáneamente de cada una de las variantes que originaban, como en las características bioquímicas de los confórmeros generados. Extrapolando a un escenario de infección natural la información obtenida mediante este modelo *in vitro*, permitiría hipotetizar la posibilidad de que pudieran emerger numerosas cepas diferentes de caquexia crónica en caso de que se diese una forma espontánea de la enfermedad en cérvidos con PrP^C basada en diferentes secuencias aminoacídicas. No obstante, considerando la alta tasa de infectividad de esta enfermedad priónica, el interés no radica tanto en las características de las cepas originadas espontáneamente en cérvidos con una PrP^C de secuencia aminoacídica poco frecuente, sino en cómo evolucionan estas cepas al infectar a otros miembros de la familia *Cervidae*, es decir, al propagar en PrP^C de cérvido con otras secuencias aminoacídicas. En este sentido, lo más probable es que, de darse un fenómeno de este tipo en la naturaleza, las PrP^C de cérvido en las que estas nuevas cepas teóricas propagarían serían aquellas de genotipo más frecuente, las cuales se corresponderían con las PrP^C de corzo o de uapití, dependiendo de la región geográfica. Tal y como se ha indicado previamente, la única diferencia entre las secuencias aminoacídicas de las PrP^C de corzo y uapití radica en la posición 226 de esta proteína, presentando la PrP^C de corzo el aminoácido glutamina y la PrP^C de uapití el aminoácido glutamato.

6.1.- Efecto de la presencia de los aminoácidos glutamina o glutamato en el residuo 226 de la PrP sobre las características de las PrP recombinantes de corzo y uapití malplegadas espontáneamente *in vitro*

Con el objetivo de estudiar la evolución de las potenciales cepas obtenidas utilizando todas las variantes polimórficas de cérvidos tras su propagación en las variantes más comunes, se analizó primero este fenómeno con los confórmeros de corzo y uapití mediante su propagación en la rec-PrP no homóloga, es decir las semillas de corzo en la rec-PrP de uapití y viceversa. De esta forma, se deseaba determinar la conveniencia de utilizar una o ambas de las variantes polimórficas más frecuentes.

Para ello, las semillas recombinantes de corzo y uapití obtenidas por malplegamiento espontáneo *in vitro* en presencia y ausencia de cofactor se utilizaron en un ensayo de propagación por PMSA en sustratos basados en las rec-PrP de corzo y uapití. Así, se realizaron experimentos de adaptación de cada una de las semillas recombinantes indicadas a un sustrato basado en rec-PrP de secuencia aminoacídica

RESULTADOS

no homóloga (las semillas de corzo se adaptaron a la secuencia de la PrP de uapití y viceversa) en presencia y ausencia de dextrano sulfatado, para después volver a ser readaptadas a su sustrato original, con posterior caracterización bioquímica de los confórmeros generados en el proceso (Figura 28a). La adaptación a la secuencia aminoacídica de la PrP de corzo o uapití se efectuó siguiendo un procedimiento análogo al utilizado en la adaptación a medios con y sin cofactor, es decir, mediante dos rondas seriadas de PMSA utilizando esferas de zirconio-sílice con rec-PrP^{res} adsorbida como semilla, seguidas de una tercera ronda con la finalidad de producir la adsorción y saturación del nuevo confórmero obtenido tras la adaptación a la superficie de esferas de zirconio-sílice. En este caso, cada ronda de PMSA tuvo una duración de 6 horas. Tras comprobar por digestión con PK, electroforesis y tinción de proteína total el resultado de la adaptación y la capacidad de propagación de las esferas con los nuevos confórmeros adsorbidas a ellas, se llevó a cabo el proceso de readaptación al sustrato de origen de cada semilla recombinante. En la figura 28b se puede observar el resultado de estos procesos de adaptación y readaptación, permitiendo apreciar cambios en el patrón de movilidad electroforética en algunos de los confórmeros y evidenciando así una aparente evolución de las cepas potenciales tras su propagación en rec-PrP con el aminoácido no homólogo en la posición 226.

RESULTADOS

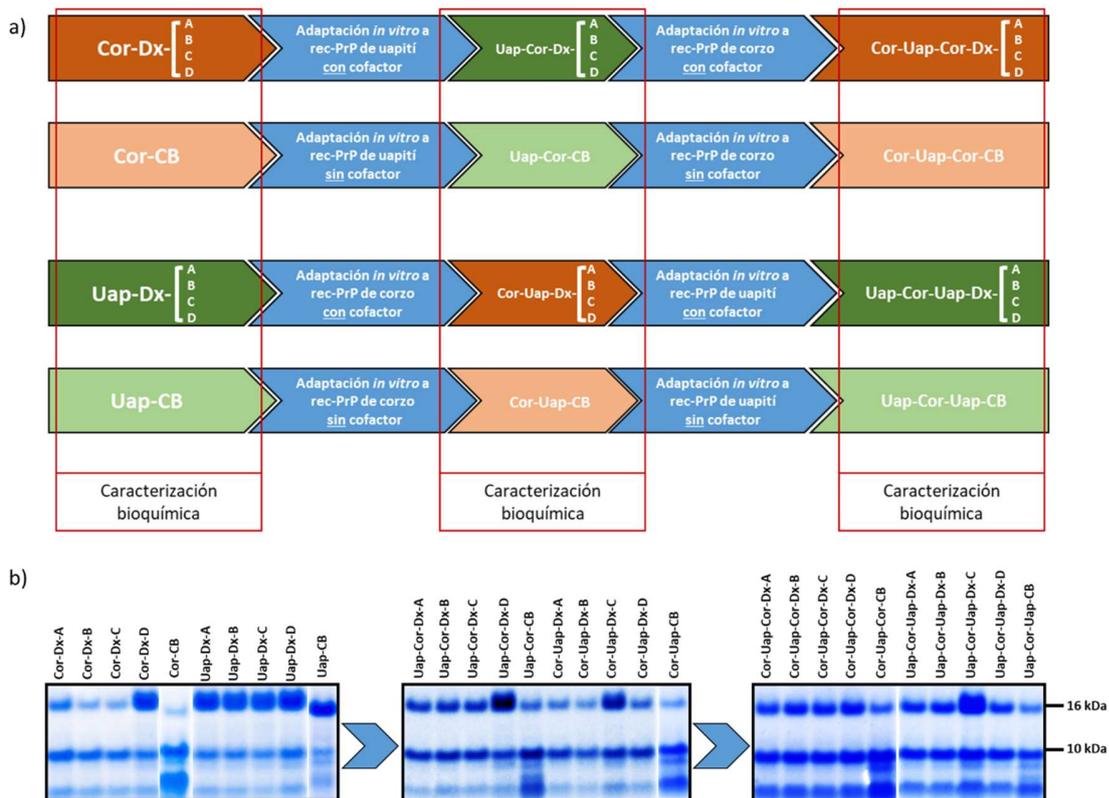


Figura 28. Efecto del aminoácido presente en el residuo 226 de la PrP sobre las características bioquímicas de las rec-PrP de corzo y uapití malplegadas espontáneamente *in vitro*. a) Flujo de trabajo esquemático de la evaluación del efecto del residuo 226 de la PrP sobre las propiedades bioquímicas de los confórmers de corzo y uapití. Este estudio se llevó a cabo mediante la adaptación de las semillas recombinantes de corzo a sustrato con rec-PrP de uapití y viceversa, y readaptación al sustrato de origen, con caracterización bioquímica de los confórmers generados. b) Adaptación de las semillas recombinante de corzo a la rec-PrP de uapití y viceversa y readaptación a sus rec-PrP de origen. Los procesos de adaptación y readaptación se llevaron a cabo mediante dos rondas seriadas de PMSA de 6 horas cada una utilizando esferas de zirconio-sílice con rec-PrP^{res} adsorbidas a su superficie como semilla. Se llevó a cabo una tercera ronda de adsorción y saturación de los nuevos confórmers de rec-PrP^{res} a la superficie de esferas de zirconio-sílice. Los confórmers de corzo mantuvieron su patrón electroforético al adaptarse a la rec-PrP de uapití, cambiando el patrón de uno de ellos, Uap-Cor-Dx-D, al readaptarse a la rec-PrP de corzo. Por su parte, cuatro de los cinco confórmers de uapití sufrieron cambios en su patrón electroforético al adaptarse a la rec-PrP de corzo, los cuales se mantuvieron al readaptarse a la rec-PrP de uapití.

La aplicación del panel de caracterización bioquímica a todas las semillas recombinantes generadas en los procesos descritos confirmó una modificación de las propiedades de la mayoría de los confórmers analizados, observándose únicamente dos cepas cuyas características no variaron. De este modo, la evolución de las características bioquímicas de cepa durante los procesos de adaptación a diferentes rec-PrP podría ser considerada como un criterio añadido para la clasificación de cepas (Tabla 7):

RESULTADOS

- La cepa potencial $\alpha 0(-)$, obtenida mayoritariamente por malplegamiento espontáneo *in vitro* de la rec-PrP de corzo en presencia de dextrano, y la cepa potencial $\epsilon 1(-)$, característica del confórmero Cor-CB, constituyen los únicos casos en los que las propiedades bioquímicas típicas de cada cepa se mantuvieron inalteradas tras los procesos de adaptación y readaptación.
- En cambio, la cepa potencial $\beta 1(+)$ mostró tres tipos de evolución posibles, sugiriendo que, debido a las limitaciones del panel bioquímico utilizado, se consideraron como iguales tres cepas potenciales diferentes:
 - En el caso del confórmero Cor-Dx-D, la barrera de transmisión a la rec-PrP de oveja con genotipo ARQ desapareció al adaptar esta semilla recombinante a la secuencia aminoacídica del uapití, manteniendo igual el patrón electroforético y la capacidad de ser detectado por el anticuerpo 12B2. La cepa potencial resultante de este proceso, $\beta 0(+)$, no se encuentra entre las obtenidas por malplegamiento espontáneo en uapití, sugiriendo que desde su origen el confórmero Cor-Dx-D constituía una cepa diferente de las de uapití, a pesar de compartir características bioquímicas de acuerdo al panel de caracterización. Cuando esta nueva cepa, $\beta 0(+)$, se volvió a adaptar a la rec-PrP de corzo, cambió su patrón electroforético y la capacidad de ser detectada con 12B2, dando lugar a la cepa $\alpha 0(-)$, la obtenida más frecuentemente por malplegamiento espontáneo de la rec-PrP de corzo en particular y de cérvidos en general.
 - Los confórmeros Uap-Dx-A, Uap-Dx-B y Uap-Dx-D sufrieron un cambio en todas sus características de cepa al adaptarse a la secuencia aminoacídica de corzo, dando lugar a la cepa $\alpha 0(-)$, la cual se mantuvo al ser readaptada a la rec-PrP de uapití. Esto sugiere que estos tres confórmeros sí podrían ser la misma cepa, la cual evoluciona al ser adaptada a la rec-PrP de corzo.
 - El confórmero Uap-Dx-C demostró ser diferente al resto de semillas recombinantes de uapití al haber mantenido el patrón electroforético tras su adaptación a la rec-PrP de corzo y posterior readaptación a la rec-PrP de uapití. Sin embargo, no ocurrió lo mismo con sus otras características bioquímicas, ya que tras la primera adaptación sufrió una variación en su capacidad de propagación en rec-PrP de oveja ARQ, pasando de ser la cepa potencial $\beta 1(+)$ a ser la $\beta 0(+)$, y tras su readaptación perdió la capacidad de ser reconocida por el anticuerpo 12B2, pasando a ser la cepa potencial $\beta 0(-)$. Aunque los confórmeros adaptados Uap-Cor-Dx-D y Cor-Uap-Dx-C comparten las mismas características bioquímicas, siendo ambos del tipo $\beta 0(+)$, la diferencia del

RESULTADOS

comportamiento en su evolución sugiere que en realidad no son la misma cepa. Esto concuerda con los resultados obtenidos en los estudios *in vivo*, en los que Uap-Dx-C demostró ser una cepa diferente a, al menos, Uap-Dx-A.

- Finalmente, el confórmero Uap-CB, caracterizado como la cepa potencial $\delta 1(-)$, sufre un cambio en su patrón electroforético al ser adaptada a la rec-PrP de corzo, pasando a ser la cepa potencial $\epsilon 1(-)$, cuyas características no variaron tras ser readaptada a la rec-PrP de uapití.

Tabla 7. Caracterización bioquímica *in vitro* de las semillas recombinantes de corzo y uapití obtenidas en presencia y ausencia de cofactor y de los confórmeros generados tras su adaptación a las rec-PrP de uapití y corzo, respectivamente, y su readaptación al sustrato de origen.

Confórmero seleccionado	Potencial cepa	Adaptación	Confórmero adaptado	Potencial cepa	Readaptación	Confórmero readaptado	Potencial cepa
Cor-Dx-A	$\alpha 0(-)$	Q226Q → Q226E	Uap-Cor-Dx-A	$\alpha 0(-)$	Q226E → Q226Q	Cor-Uap-Cor-Dx-A	$\alpha 0(-)$
Cor-Dx-B	$\alpha 0(-)$		Uap-Cor-Dx-B	$\alpha 0(-)$		Cor-Uap-Cor-Dx-B	$\alpha 0(-)$
Cor-Dx-C	$\alpha 0(-)$		Uap-Cor-Dx-C	$\alpha 0(-)$		Cor-Uap-Cor-Dx-C	$\alpha 0(-)$
Cor-Dx-D	$\beta 1(+)$		Uap-Cor-Dx-D	$\beta 0(+)$		Cor-Uap-Cor-Dx-D	$\alpha 0(-)$
Cor-CB	$\epsilon 1(-)$	Q226E → Q226Q	Uap-Cor-CB	$\epsilon 1(-)$	Q226Q → Q226E	Cor-Uap-Cor-CB	$\epsilon 1(-)$
Uap-Dx-A	$\beta 1(+)$		Cor-Uap-Dx-A	$\alpha 0(-)$		Uap-Cor-Uap-Dx-A	$\alpha 0(-)$
Uap-Dx-B	$\beta 1(+)$		Cor-Uap-Dx-B	$\alpha 0(-)$		Uap-Cor-Uap-Dx-B	$\alpha 0(-)$
Uap-Dx-C	$\beta 1(+)$		Cor-Uap-Dx-C	$\beta 0(+)$		Uap-Cor-Uap-Dx-C	$\beta 0(-)$
Uap-Dx-D	$\beta 1(+)$		Cor-Uap-Dx-D	$\alpha 0(-)$		Uap-Cor-Uap-Dx-D	$\alpha 0(-)$
Uap-CB	$\delta 1(-)$		Cor-Uap-CB	$\epsilon 1(-)$		Uap-Cor-Uap-CB	$\epsilon 1(-)$

Cada confórmero se clasificó como una potencial cepa en función de las propiedades bioquímicas evaluadas mediante el panel de caracterización. El nombre de cada potencial cepa se compone de tres caracteres que resumen las siguientes propiedades de cada confórmero:

- La letra del alfabeto griego representa el patrón electroforético presentado por el confórmero.
- Los valores numéricos 0 o 1 hacen referencia a la ausencia o presencia de barrera de transmisión a oveja ARQ, respectivamente.
- El signo positivo, (+), o negativo, (-), se correlaciona con la capacidad del confórmero de ser detectado o no, respectivamente, por el anticuerpo 12B2.

Cabe destacar una convergencia hacia la potencial cepa $\alpha 0(-)$ cuando los confórmeros de uapití, ya sean generados en esta rec-PrP o adaptados a ella, fueron adaptados a la rec-PrP de corzo en presencia de dextrano sulfatado. Un fenómeno similar tiene lugar con los confórmeros generados en ausencia de cofactor, convergiendo las potenciales cepas a $\epsilon 1(-)$.

Los resultados descritos demuestran que la presencia de un aminoácido glutamina o un aminoácido glutamato en el residuo 226 de la PrP de cérvido induce, en la mayoría de los casos, cambios en las características bioquímicas de confórmeros con genotipo diferente. Cabe destacar cómo esos cambios conllevan, en todos los casos, a la homogeneización de las características de cepa, reduciendo la variabilidad de las mismas, siendo las cepas potenciales más frecuentes tras la adaptación la $\alpha 0(-)$ en los casos en los que el malplegamiento *in vitro* ha sido inducido por dextrano sulfatado y $\epsilon 1(-)$ en los casos en los que el malplegamiento ha tenido lugar en un ambiente libre de cofactor. En ambos casos, la convergencia de las características bioquímicas de los diferentes confórmeros en las dos cepas potenciales citadas se vio mediada por la propagación en rec-PrP de corzo, de manera que esta secuencia aminoacídica, con una glutamina en la posición 226, parece tener una mayor influencia en la modificación de las semillas recombinantes generadas.

RESULTADOS

6.2.- Evolución de las características bioquímicas de las variantes polimórficas de las PrP recombinantes de cérvidos malplegadas espontáneamente *in vitro* tras su adaptación a la secuencia aminoacídica de la PrP de corzo

Con el objetivo de evaluar el riesgo de generación de nuevas cepas como consecuencia de la transmisión de potenciales confórmeros surgidos espontáneamente en variantes infrecuentes de las PrP de cérvido a los genotipos frecuentes de las mismas, se llevó a cabo una aproximación *in vitro* de dicho fenómeno. La capacidad de modificación de las características de cepa observada en la rec-PrP de corzo, con mayor tendencia aparente a la formación de confórmeros $\alpha 0(-)$, junto con la mayor frecuencia de este genotipo a nivel global con respecto al de uapití, propició la decisión de realizar un estudio de adaptación de todas las variantes polimórficas malplegadas espontáneamente *in vitro* únicamente a la secuencia aminoacídica del corzo, seguido de la caracterización de los confórmeros generados (Figura 29). El proceso de adaptación de todas las variantes polimórficas obtenidas por malplegamiento espontáneo *in vitro* a la secuencia aminoacídica de corzo se llevó a cabo siguiendo la metodología de rondas seriadas de PMSA de 6 horas de duración, utilizando como semillas esferas con rec-PrP^{res} adsorbida, seguidas de una ronda de adsorción y saturación de los confórmeros adaptados a nuevas esferas de zirconio-sílice. Una vez completada la adaptación a la rec-PrP de corzo, se llevó a cabo la caracterización *in vitro* de los nuevos confórmeros obtenidos mediante la aplicación del panel de pruebas basadas en sus propiedades bioquímicas.



Figura 29. Flujo de trabajo esquemático del proceso de obtención de semillas recombinantes obtenidas por malplegamiento espontáneo *in vitro* de las variantes polimórficas de las PrP de cérvidos y su adaptación a la secuencia aminoacídica de corzo, con caracterización bioquímica de los confórmeros generados.

El análisis del patrón electroforético observado en los confórmeros adaptados a la rec-PrP de corzo, analizado por digestión con PK seguido de electroforesis y tinción de proteína total, únicamente permitió identificar 2 nuevos patrones electroforéticos, concordando este dato con la esperada convergencia de las propiedades bioquímicas tras la adaptación. Estos patrones de movilidad electroforética se pueden observar en la figura 30, mediante la imagen de un confórmero representativo de cada patrón observado en la figura 30a y mediante una representación gráfica en la figura 30b, en la que se asocian con una letra del alfabeto griego.

RESULTADOS

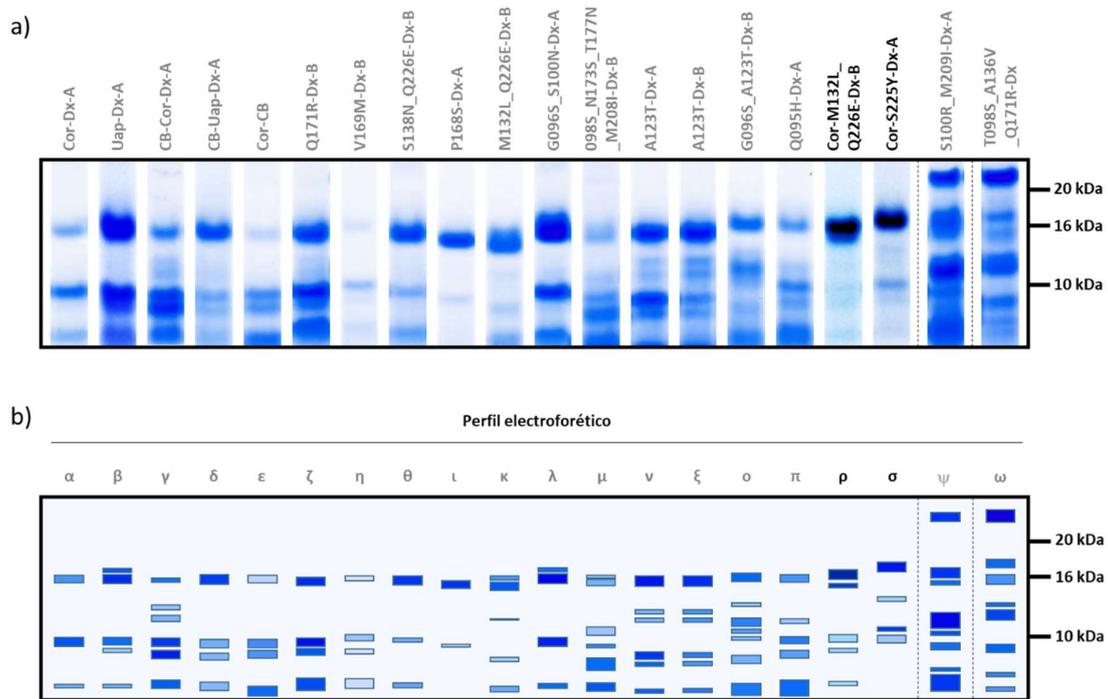


Figura 30. Patrones de movilidad electroforética observados en las semillas recombinantes obtenidas tras la adaptación a la rec-PrP de corzo de los conforméromos malplegados espontáneamente *in vitro* a partir de las variantes polimórficas de las PrP de cérvidos. a) Electroforesis y tinción de proteína total de una rec-PrP^{res} de cérvido representativa para cada patrón electroforético diferente observado. **b)** Representación gráfica de los diferentes patrones de movilidad electroforética observados entre las rec-PrP^{res} de cérvido analizadas. La representación gráfica de cada patrón electroforético se muestra bajo la imagen de electroforesis y tinción de proteína total de la rec-PrP^{res} de cérvido representativa de cada uno de estos patrones. Se puede observar en gris el nombre de los conforméromos y la letra griega asignados a los patrones electroforéticos que ya han sido descritos en apartados anteriores.

El resultado final de la caracterización bioquímica de todos los conforméromos adaptados se encuentra recogido en las tablas 8, 9 y 10, organizadas estas para representar diferentes regiones de la rec-PrP, tal y como se ha especificado previamente. En ellas se puede observar cómo las 24 cepas potenciales diferentes obtenidas mediante el malplegamiento espontáneo de las variantes polimórficas recombinantes de las PrP de cérvidos evolucionaron durante el proceso de adaptación a la rec-PrP de corzo convergiendo la mayoría en la cepa potencial $\alpha 0(-)$. De este modo, se describen un total de 8 cepas potenciales diferentes entre los conforméromos adaptados:

- La cepa mayoritaria, $\alpha 0(-)$, presente en 85 de los 106 conforméromos adaptados analizados. Esta cepa potencial se obtuvo a partir de las rec-PrP^{res} de todas aquellas variantes caracterizadas en su origen por el patrón de movilidad electroforética α , así como de la mayoría de las cepas

RESULTADOS

potenciales minoritarias y, en ciertas ocasiones, de cepas potenciales con mayor presencia como algunas de las caracterizadas por el patrón electroforético β . Esto sugiere que $\alpha 0(-)$ se podría corresponder con la conformación más termodinámicamente favorable para las PrP de cérvido en general y de corzo en particular, al menos en el entorno de propagación utilizado.

- La cepa $\beta 0(+)$ es la segunda más frecuente al ser encontrada en 10 de los 106 confórmeros adaptados. En la mayoría de las ocasiones, esta cepa procede de confórmeros caracterizados por el patrón electroforético β , siendo la única excepción la del confórmero Cor-K207M-Dx-A, que antes de la adaptación mostraba características de cepa $\zeta 1(-)$. Cabe mencionar que este es el único caso en el que esta cepa potencial, $\zeta 1(-)$, evoluciona a $\beta 0(+)$, mientras que, en los otros 6 casos en los que se ha observado, la adaptación resultó en el tipo mayoritario, $\alpha 0(-)$.
- La cepa potencial $v 0(-)$ aparece en 4 confórmeros adaptados, todos ellos procedentes de variantes polimórficas de las PrP de cérvidos con el cambio aminoacídico A123T presente en su secuencia. Las cepas potenciales de origen en estos confórmeros fueron $v 1(-)$ en dos de los casos, y $\xi 1(-)$ y $\sigma 1(-)$ en los otros dos. Mientras que $\sigma 1(-)$ solo fue descrita en el confórmero de origen, G096S_A123T-Dx-B, las cepas $v 1(-)$ y $\xi 1(-)$ se encuentran en otros confórmeros, los cuales evolucionan a cepas diferentes a $v 0(-)$. Estos resultados apuntarían a una gran relevancia del aminoácido treonina en el residuo 123 a la hora de determinar las conformaciones que puede adoptar una PrP de cérvido.
- La cuarta cepa potencial más frecuente entre los confórmeros adaptados es $\alpha 0(+)$, procedente de los confórmeros A136V-Dx-A, S138N-Dx-B y G129S_V169M-Dx-A, caracterizados como diferentes cepas potenciales en su origen y sin otra relación aparente más que la presencia de un cambio aminoacídico en la región circundante a la lámina $\beta 1$ de la rec-PrP.
- Las cepas potenciales $\sigma 0(+)$ y $\zeta 1(-)$ proceden de los dos confórmeros con el polimorfismo S225Y, los cuales fueron caracterizados como $v 1(-)$ y $\xi 1(-)$ en su origen, respectivamente. Cabe destacar que ambas cepas potenciales únicamente fueron descritas en estos confórmeros y en aquellos con el cambio aminoacídico A123T ya comentados, sugiriendo que las rec-PrP^{res} con patrones electroforéticos v y ξ que coexisten con la incapacidad de propagar en rec-PrP de oveja ARQ y de ser detectadas con 12B2, podrían corresponderse con confórmeros con mayor tendencia a formar cepas diferentes al ser adaptadas a la rec-PrP de corzo.
- Por último, las cepas potenciales $r 0(-)$ y $\beta 1(+)$ únicamente aparecen en un confórmero adaptado cada una. La cepa $r 0(-)$ surge al adaptar a la rec-PrP de corzo el confórmero M132L_Q226E-Dx-B, caracterizado por las propiedades de cepa $\kappa 0(-)$, lo que sugiere la existencia de una cepa única

RESULTADOS

capaz de propagar en rec-PrP de corzo generando otra cepa única con la sola modificación de su patrón electroforético. En el caso de la cepa potencial $\beta 1(+)$, esta se corresponde con el confórmero Cor-Dx-D, el cual no ha sufrido modificaciones al haber sido propagado en su misma rec-PrP de origen. Sin embargo, la capacidad de propagar en rec-PrP de oveja ARQ observada al adaptar este confórmero a la rec-PrP de uapití (Tabla 7), en consonancia con ese mismo efecto observado en la gran mayoría de las variantes polimórficas recombinantes adaptadas a la rec-PrP de corzo, sugiere una tendencia de los confórmeros a superar esta barrera de transmisión tras haber sido adaptados en secuencias aminoacídicas diferentes a las de origen.

Los resultados obtenidos demuestran una clara convergencia de las potenciales cepas diferentes generadas espontáneamente *in vitro* a partir de las variantes polimórficas recombinantes de las PrP de cérvidos tras su adaptación a la rec-PrP de corzo, siendo el resultado mayoritario de esta convergencia la cepa potencial $\alpha 0(-)$. Estos resultados también permiten establecer una relación entre ciertos polimorfismos, como el A123T, el S225Y o el M132L Q226E, o polimorfismos en regiones de la proteína concretas, como las inmediaciones de la lámina $\beta 1$ de la proteína priónica, con cepas potenciales capaces de evolucionar de forma diferente al ser adaptadas a la rec-PrP de corzo.

RESULTADOS

Tabla 8. Caracterización bioquímica *in vitro* de los confórmeros obtenidos por malplegamiento espontáneo mediante PMSA de las variantes polimórficas de las PrP de cérvidos cuyos cambios aminoacídicos se localizan entre los residuos 90 y 131 de la PrP tras su adaptación a la rec-PrP de corzo.

Confórmero seleccionado	Potencial cepa	Adaptación	Potencial cepa
Q095H-Dx-A	$\pi 0(-)$	Q095H \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
Q095H-Dx-B	$\theta 0(-)$		$\alpha 0(-)$
G096D-Dx-A	$\beta 0(-)$	G096D \rightarrow Q226Q	$\beta 0(+)$
G096D-Dx-B	$\alpha 0(-)$		$\alpha 0(-)$
G096R-Dx-A	$\alpha 0(-)$	G096R \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
G096R-Dx-B	$\beta 0(-)$		$\alpha 0(-)$
G096S-Dx-A	$\beta 0(-)$	G096S \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
G096S-Dx-B	$\alpha 0(-)$		$\alpha 0(-)$
Q095H_G096S-Dx-A	$\alpha 0(+)$	Q095H G096S \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
Q095H_G096S-Dx-B	$\beta 0(-)$		$\beta 0(+)$
T098A-Dx-A	$\beta 0(+)$	T098A \rightarrow Q226Q	$\beta 0(+)$
T098A-Dx-B	$\alpha 0(+)$		$\alpha 0(-)$
T098S-Dx-A	$\alpha 0(+)$	T098S \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
T098S-Dx-B	$\alpha 0(+)$		$\alpha 0(-)$
S100N-Dx-A	$\beta 0(-)$	S100N \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
S100N-Dx-B	$\beta 0(-)$		$\alpha 0(-)$
G096S_S100N-Dx-A	$\lambda 0(+)$	G096S S100N \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
G096S_S100N-Dx-B	$\lambda 0(+)$		$\alpha 0(-)$
S100G_Q226E-Dx-A	$\beta 0(+)$	S100G Q226E \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
S100G_Q226E-Dx-B	$\beta 0(+)$		$\alpha 0(-)$
N103I-Dx-A	$\beta 0(-)$	N103I \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
N103I-Dx-B	$\alpha 0(-)$		$\alpha 0(-)$
N103T-Dx-A	$\alpha 0(-)$	N103T \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
N103T-Dx-B	$\alpha 0(-)$		$\alpha 0(-)$
K109Q-Dx-A	$\alpha 0(-)$	K109Q \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
K109Q-Dx-B	$\alpha 0(+)$		$\alpha 0(-)$
A116G-Dx-A	$\alpha 0(-)$	A116G \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
A116G-Dx-B	$\alpha 0(+)$		$\alpha 0(-)$
A123T-Dx-A	$v 1(-)$	A123T \rightarrow Q226Q	$v 0(-)$
A123T-Dx-B	$\xi 1(-)$		$v 0(-)$
G096S_A123T-Dx-A	$v 1(-)$	G096S A123T \rightarrow Q226Q	$v 0(-)$
G096S_A123T-Dx-B	$o 1(-)$		$v 0(-)$
G129S-Dx-A	$\alpha 0(-)$	G129S \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
G129S-Dx-B	$\alpha 0(-)$		$\alpha 0(-)$

Cada confórmero se clasificó como una potencial cepa en función de las propiedades bioquímicas evaluadas mediante el panel de caracterización. El nombre de cada potencial cepa se compone de tres caracteres que resumen las siguientes propiedades de cada confórmero:

- La letra del alfabeto griego representa el patrón electroforético presentado por el confórmero.
- Los valores numéricos 0 o 1 hacen referencia a la ausencia o presencia de barrera de transmisión a oveja ARQ, respectivamente.
- El signo positivo, (+), o negativo, (-), se correlaciona con la capacidad del confórmero de ser detectado o no, respectivamente, por el anticuerpo 12B2.

Se puede observar una marcada convergencia hacia la potencial cepa $\alpha 0(-)$ tras la adaptación de los diferentes confórmeros a la secuencia aminoacídica de corzo. Las únicas excepciones son los confórmeros G096D-Dx-A, Q095H_G096S-Dx-B y T098A-Dx-A, cuyas potenciales cepas evolucionaron a $\beta 0(+)$, y A123T-Dx-A, A123T-Dx-B G096S_A123T-Dx-B y G096S_A123T-Dx-B cuyas potenciales cepas evolucionaron a $v 0(-)$.

RESULTADOS

Tabla 9. Caracterización bioquímica *in vitro* de los confórmers obtenidos por malplegamiento espontáneo mediante PMSA de las variantes polimórficas de las PrP de cérvidos cuyos cambios aminoacídicos se localizan entre los residuos 132 y 197 de la PrP tras su adaptación a la rec-PrP de corzo.

Confórmero seleccionado	Potencial cepa	Adaptación	Potencial cepa
M132L-Dx-A	$\beta 1(-)$	M132L \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
M132L-Dx-B	$\beta 1(-)$		$\alpha 0(-)$
M132L_Q226E-Dx-A	$\beta 0(+)$	M132L Q226E \rightarrow Q226Q	$\beta 0(+)$
M132L_Q226E-Dx-B	$\kappa 0(-)$		$\rho 0(-)$
A136V-Dx-A	$\nu 0(+)$	A136V \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(+)$
A136V-Dx-B	$\nu 1(-)$		$\alpha 0(-)$
S138N-Dx-A	$\beta 0(+)$	S138N \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
S138N-Dx-B	$\beta 0(+)$		$\alpha 0(+)$
S138N_Q226E-Dx-A	$\alpha 0(-)$	S138N Q226E \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
S138N_Q226E-Dx-B	$\theta 1(-)$		$\alpha 0(-)$
N103T_R151H-Dx-A	$\theta 0(-)$	N103T R151H \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
N103T_R151H -Dx-B	$\theta 0(-)$		$\alpha 0(-)$
Y153F-Dx-A	$\alpha 0(+)$	Y153F \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
Y153F-Dx-B	$\alpha 0(-)$		$\alpha 0(-)$
P168S-Dx-A	$\iota 1(-)$	P168S \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
P168S-Dx-B	$\iota 1(-)$		$\alpha 0(-)$
T098A_P168S-Dx-A	$\alpha 0(-)$	T098A P168S \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
T098A_P168S-Dx-B	$\iota 1(-)$		$\alpha 0(-)$
V169M-Dx-A	$\epsilon 1(-)$	V169M \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
V169M-Dx-B	$\eta 1(-)$		$\alpha 0(-)$
G129S_V169M-Dx-A	$\pi 0(-)$	G129S V169M \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(+)$
G129S_V169M-Dx-B	$\epsilon 1(-)$		$\sigma 0(-)$
D170G-Dx-A	$\alpha 1(-)$	D170G \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
D170G-Dx-B	$\alpha 1(-)$		$\alpha 0(-)$
Q171R-Dx-A	$\iota 0(-)$	Q171R \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
Q171R-Dx-B	$\zeta 1(-)$		$\alpha 0(-)$
N173S-Dx-A	$\beta 0(-)$	N173S \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
N173S-Dx-B	$\zeta 1(-)$		$\alpha 0(-)$
N176D-Dx-A	$\alpha 1(+)$	N176D \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
N176D-Dx-B	$\beta 1(-)$		$\alpha 0(-)$
T177N-Dx-A	$\zeta 0(-)$	T177N \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
T177N-Dx-B	$\alpha 1(-)$		$\alpha 0(-)$
V187I-Dx-A	$\alpha 1(-)$	V187I \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
V187I-Dx-B	$\zeta 1(-)$		$\alpha 0(-)$
T191A_Q226E-Dx-A	$\alpha 0(+)$	T191A Q226E \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
T191A_Q226E-Dx-B	$\beta 0(-)$		$\alpha 0(-)$
G096S_V192I-Dx-A	$\alpha 0(-)$	G096S V192I \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
G096S_V192I-Dx-B	$\alpha 0(-)$		$\alpha 0(-)$
K197E-Dx-A	$\alpha 0(+)$	K197E \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
K197E-Dx-B	$\alpha 1(-)$		$\alpha 0(-)$

Cada confórmero se clasificó como una potencial cepa en función de las propiedades bioquímicas evaluadas mediante el panel de caracterización. El nombre de cada potencial cepa se compone de tres caracteres que resumen las siguientes propiedades de cada confórmero:

- La letra del alfabeto griego representa el patrón electroforético presentado por el confórmero.
- Los valores numéricos 0 o 1 hacen referencia a la ausencia o presencia de barrera de transmisión a oveja ARQ, respectivamente.
- El signo positivo, (+), o negativo, (-), se correlaciona con la capacidad del confórmero de ser detectado o no, respectivamente, por el antígeno 12B2.

La variedad de potenciales cepas mostrada por los confórmers incluidos en esta tabla quedó drásticamente reducida tras la adaptación a la rec-PrP de corzo, observándose una convergencia casi total hacia la potencial cepa $\alpha 0(-)$. La única excepción es la evolución a las potenciales cepas $\alpha 0(+)$, $\beta 0(+)$, $\rho 0(-)$ y $\sigma 0(-)$ observada en seis confórmers diferentes.

RESULTADOS

Tabla 10. Caracterización bioquímica *in vitro* de los confórmers obtenidos por malplegamiento espontáneo mediante PMSA de las variantes polimórficas de las PrP de cérvidos cuyos cambios aminoacídicos se localizan entre los residuos 198 y 234 de la PrP tras su adaptación a la rec-PrP de corzo.

Confórmero seleccionado	Potencial cepa	Adaptación	Potencial cepa
K207M-Dx-A	$\zeta 1(-)$	K207M \rightarrow Q226Q	$\beta 0(+)$
K207M-Dx-B	$\alpha 0(-)$		$\alpha 0(-)$
M208I_Q226E-Dx-A	$\zeta 1(-)$	M208I Q226E \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
M208I_Q226E-Dx-B	$\alpha 0(+)$		$\alpha 0(-)$
T098S_N173S_T177N_M208I-Dx-A	$\alpha 0(+)$	T098S N173S T177N M208I \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
T098S_N173S_T177N_M208I-Dx-B	$\mu 0(-)$		$\alpha 0(-)$
M209I-Dx-A	$\beta 0(-)$	M209I \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
M209I-Dx-B	$\beta 0(-)$		$\alpha 0(-)$
S100R_M209I-Dx-A	$\beta 0(-)$	S100R M209I \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
S100R_M209I-Dx-B	$\beta 0(+)$		$\alpha 0(-)$
R211Q-Dx-A	$\beta 1(+)$	R211Q \rightarrow Q226Q	$\beta 0(+)$
R211Q-Dx-B	$\alpha 1(-)$		$\alpha 0(-)$
Q215K-Dx-A	$\beta 1(-)$	Q215K \rightarrow Q226Q	$\beta 0(+)$
Q215K-Dx-B	$\beta 1(-)$		$\beta 0(+)$
S225F-Dx-A	$\zeta 1(-)$	S225F \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
S225F-Dx-B	$\zeta 1(-)$		$\alpha 0(-)$
S225Y-Dx-A	$\nu 1(-)$	S225Y \rightarrow Q226Q	$\sigma 0(+)$
S225Y-Dx-B	$\xi 1(-)$		$\zeta 1(-)$
Cor-Dx-A	$\alpha 0(-)$	Q226Q \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
Cor-Dx-B	$\alpha 0(-)$		$\alpha 0(-)$
Cor-Dx-C	$\alpha 0(-)$		$\alpha 0(-)$
Cor-Dx-D	$\beta 1(+)$		$\beta 1(+)$
Uap-Dx-A	$\beta 1(+)$	Q226E \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
Uap-Dx-B	$\beta 1(+)$		$\alpha 0(-)$
Uap-Dx-C	$\beta 1(+)$		$\beta 0(+)$
Uap-Dx-D	$\beta 1(+)$		$\alpha 0(-)$
Q226K-Dx-A	$\alpha 1(-)$	Q226K \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
Q226K-Dx-B	$\beta 0(-)$		$\alpha 0(-)$
Q226R-Dx-A	$\zeta 0(-)$	Q226R \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
Q226R-Dx-B	$\alpha 0(-)$		$\alpha 0(-)$
Q230L-Dx-A	$\alpha 0(-)$	Q230L \rightarrow Q226Q	$\alpha 0(-)$
Q230L-Dx-B	$\beta 1(+)$		$\beta 0(+)$

Cada confórmero se clasificó como una potencial cepa en función de las propiedades bioquímicas evaluadas mediante el panel de caracterización. El nombre de cada potencial cepa se compone de tres caracteres que resumen las siguientes propiedades de cada confórmero:

- La letra del alfabeto griego representa el patrón electroforético presentado por el confórmero.
- Los valores numéricos 0 o 1 hacen referencia a la ausencia o presencia de barrera de transmisión a oveja ARQ, respectivamente.
- El signo positivo, (+), o negativo, (-), se correlaciona con la capacidad del confórmero de ser detectado o no, respectivamente, por el anticuerpo 12B2.

Es entre los confórmers con polimorfismos en la región C- terminal donde menor es la convergencia hacia la potencial cepa $\alpha 0(-)$, sugiriendo una gran importancia de esta región en el malplegamiento y modulación de las características de cepa.

RESULTADOS

7.- Rol del extremo C-terminal en el malplegamiento de las PrP de cérvidos

Los últimos avances en el estudio de la isoforma malplegada de la PrP mediante cryoEM han permitido no solo resolver su estructura, sino también definir las regiones de la proteína que podrían ser clave en la determinación de las propiedades distintivas de las cepas priónicas (115). La resolución de la estructura de una variante sin anclaje por GPI y, por ende, sin modificaciones postraduccionales de la cepa priónica de ratón RML (409) ofrece el modelo estructural más cercano hasta la fecha a un prion recombinante. El estudio comparativo de este modelo con otras cepas con estructura resuelta apunta a las diferencias conformacionales observadas en ciertas regiones de la PrP como responsables de la formación de distintas cepas, destacando la región correspondiente al extremo C- terminal (410). Por otra parte, tal y como se ha podido observar en los estudios de adaptación de semillas recombinantes de cérvidos a la rec-PrP de corzo y uapití, una diferencia tan pequeña en esta región C- terminal como es la presencia del aminoácido glutamina o del aminoácido glutamato en el residuo 226 provoca grandes diferencias en las características de las cepas resultantes. Así, la importancia del extremo C- terminal en general y del residuo 226 de la PrP de cérvido en particular quedó confirmada tanto bibliográfica como experimentalmente. Sin embargo, con el objetivo de ahondar más en el rol que desempeña esta región en la generación de cepas priónicas, se diseñó una rec-PrP de cérvido con una delección del extremo C-terminal, más concretamente, de los aminoácidos 226 a 233, ambos inclusive. De esta manera, la nueva PrP recombinante de cérvido, denominada CerviDel, abría un nuevo abanico de posibilidades en el estudio de la generación de potenciales cepas al carecer del característico residuo 226 de las PrP de cérvidos (Figura 31).

El ORF de la rec-PrP CerviDel se obtuvo por síntesis génica y se subclonó en el mismo vector de expresión utilizado en el caso de las rec-PrP de corzo y uapití. Tras esto, el vector fue transformado en bacterias competentes a las cuales se les indujo la producción de la rec-PrP, que finalmente fue purificada para su estudio.

RESULTADOS



Figura 31. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las PrP recombinantes de corzo y uapití con la rec-PrP CerviDel. La rec-PrP CerviDel posee una secuencia aminoacídica idéntica a las del corzo y el uapití con la única diferencia del extremo C- terminal, donde se introdujo una delección. Esta delección comienza en el residuo 226, eliminando así la única diferencia existente entre las rec-PrP de corzo y de uapití. Bajo las secuencias se representa el grado de homología en cada residuo. Un asterisco (*) representa una homología del 100%, es decir, el mismo aminoácido se encuentra en la misma posición en las dos secuencias, mientras que un espacio representa una homología nula.

7.1.- Efecto del extremo C-terminal de la PrP en la evolución de las características de las PrP recombinantes de corzo y uapití malplegadas espontáneamente *in vitro*

La primera aproximación al análisis del efecto de la delección C-terminal en la generación de cepas de la rec-PrP CerviDel fue mediante la adaptación a un sustrato basado en esta variante artificial de las semillas recombinantes de corzo y uapití obtenidas por malplegamiento espontáneo *in vitro* en ausencia y presencia de dextrano. Al igual que en estudios previos, la adaptación de los confórmeros de corzo y uapití a la secuencia de CerviDel estuvo seguida de la readaptación de las nuevas semillas recombinantes obtenidas a su sustrato de origen y de la caracterización de todas las rec-PrP^{res} generadas (Figura 32a). Tanto los procesos de adaptación como readaptación se llevaron a cabo mediante dos rondas seriadas de PMSA de 6 horas cada una utilizando esferas de zirconio-sílice con rec-PrP^{res} adsorbida como semilla, con una tercera ronda de adsorción y saturación de los nuevos confórmeros a la superficie de esferas de zirconio-sílice. En la Figura 32b se pueden apreciar los resultados de las diferentes fases de este procedimiento, analizados mediante digestión con PK, electroforesis y tinción de proteína total.

RESULTADOS

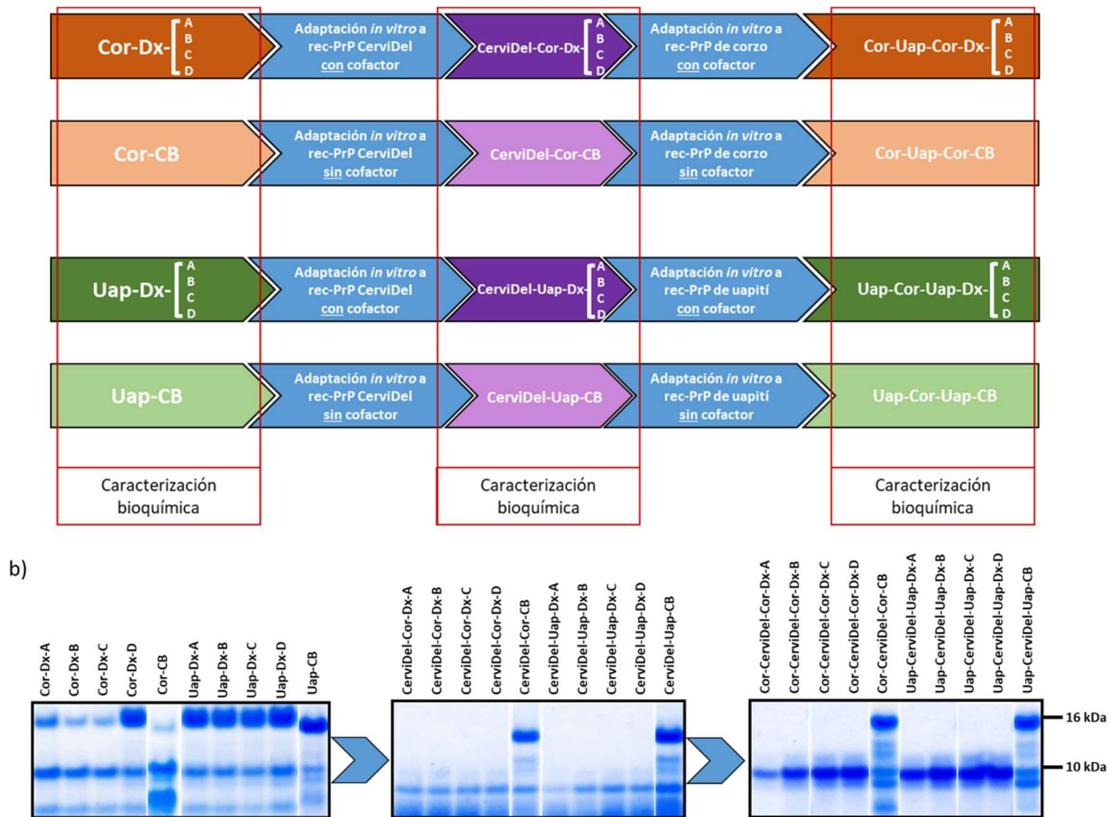


Figura 32. Efecto de una delección en el extremo C- terminal de la PrP sobre las características bioquímicas de las rec-PrP de corzo y uapití malplegadas espontáneamente *in vitro*. **a)** Flujo de trabajo esquemático de la evaluación del efecto de una delección en el extremo C- terminal de la PrP sobre las propiedades bioquímicas de los confórmers de corzo y uapití. Este estudio se llevó a cabo mediante la adaptación de las semillas recombinantes de corzo y uapití a sustrato con rec-PrP CerviDel y readaptación al sustrato de origen, con caracterización bioquímica de los confórmers generados. **b)** Adaptación de las semillas recombinante de corzo y uapití a sustrato con rec-PrP CerviDel y readaptación al sustrato de origen. Los procesos de adaptación y readaptación se llevaron a cabo mediante dos rondas seriadas de PMSA de 6 horas cada una utilizando esferas de zirconio-sílice con rec-PrP^{res} adsorbidas a su superficie como semilla. Se llevó a cabo una tercera ronda de adsorción y saturación de los nuevos confórmers de rec-PrP^{res} a la superficie de esferas de zirconio-sílice. Los confórmers de corzo y uapití generados en presencia de cofactor sufrieron un cambio drástico en su patrón electroforético al ser adaptados a la rec-PrP CerviDel, manteniendo un patrón similar a este al ser readaptados a sus sustratos de origen. Los confórmers de corzo y uapití generados en ausencia de cofactor también sufrieron modificaciones en su patrón al adaptarse a la rec-PrP CerviDel, pero los cambios fueron más sutiles.

Como se puede observar, todos los confórmers obtenidos en presencia de dextrano sulfatado, tanto de corzo como de uapití, adoptan un patrón electroforético inédito carente de la banda de 16 kDa característica de los priones *bona fide*, el cual se mantiene con unos leves cambios en todos estos confórmers al volver a ser adaptados a su secuencia aminoacídica de origen. En el caso de las semillas recombinantes de corzo y uapití malplegadas espontáneamente en ausencia de cofactor, ambas adoptan

RESULTADOS

un patrón electroforético común al ser adaptadas a la secuencia de CerviDel, siendo más parecido a los patrones más típicos observados en otras rec-PrP^{res} de variantes de cérvidos. Al volver a adaptar los confórmeros resultantes a la rec-PrP de origen de cada uno de ellos, se puede apreciar cómo el patrón electroforético cambia ligeramente. Estos patrones electroforéticos pueden observarse en la Figura 33a como la imagen de un confórmero representativo de cada uno de ellos y en la Figura 33b mediante una representación gráfica que asocia cada patrón de movilidad electroforética con una letra del alfabeto griego.

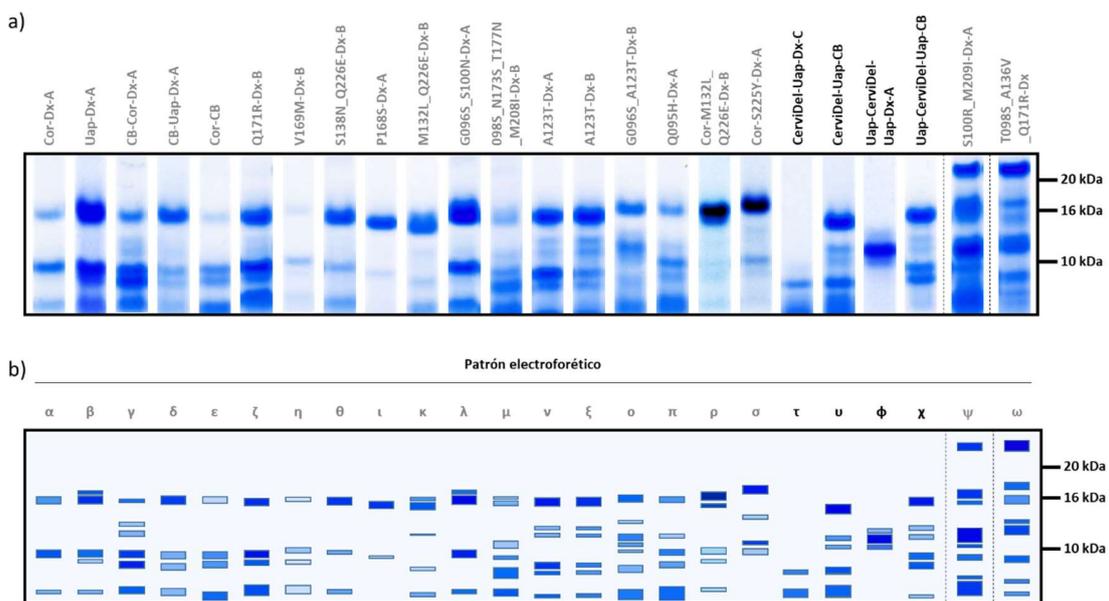


Figura 33. Patrones de movilidad electroforética observados en las semillas recombinantes obtenidas tras la adaptación a rec-PrP CerviDel de los confórmeros de corzo y uapití malplegados espontáneamente *in vitro*. a) Electroforesis y tinción de proteína total de una rec-PrP^{res} de cérvido representativa para cada patrón electroforético diferente observado. b) Representación gráfica de los diferentes patrones de movilidad electroforética observados entre las rec-PrP^{res} de cérvido analizadas. La representación gráfica de cada patrón electroforético se muestra bajo la imagen de electroforesis y tinción de proteína total de la rec-PrP^{res} de cérvido representativa de cada uno de estos patrones. Se puede observar en gris el nombre de los confórmeros y la letra griega asignados a los patrones electroforéticos que ya han sido descritos en apartados anteriores.

La caracterización bioquímica de los confórmeros generados, llevada a cabo mediante la aplicación del panel descrito, permitió diferenciar 5 potenciales cepas nuevas, tal y como se recoge en la tabla 11:

- Las potenciales cepas $\tau 1(-)$ y $\phi 1(-)$ fueron obtenidas tras la adaptación de los confórmeros de corzo y uapití malplegados en presencia de cofactor tras su adaptación a la rec-PrP CerviDel y posterior readaptación a su rec-PrP de origen, respectivamente. En ambos casos $\tau 1(-)$ y $\phi 1(-)$ se

RESULTADOS

caracterizan por patrones electroforéticos que carecen de banda de 16 kDa, la presencia de una barrera de transmisión que impide su propagación en rec-PrP de oveja con el genotipo ARQ y su incapacidad para ser detectadas con el anticuerpo 12B2. La generación de potenciales cepas con patrones tan característicos únicamente en aquellos casos en los que las semillas adaptadas se obtuvieron en presencia de dextrano sulfatado sugiere que este cofactor podría interactuar con el extremo C- terminal de la rec-PrP^{res} y que, en ausencia de esta región, esa interacción desaparece, traduciéndose en una conformación diferente a la típicamente observada en los priones recombinantes *bona fide*.

- Las potenciales cepas $\upsilon 1(-)$ y $\upsilon 1(+)$, obtenidas de la adaptación a la rec-PrP CerviDel de los confórmeros Cor-CB y Uap-CB, respectivamente, difieren únicamente en la capacidad de la segunda de ser detectada con el anticuerpo 12B2. Esta diferencia desaparece cuando son readaptadas a sus secuencias aminoacídicas de origen, obteniéndose en ambos casos la potencial cepa $\chi 1(-)$.

RESULTADOS

Tabla 11. Caracterización bioquímica *in vitro* de las semillas recombinantes de corzo y uapití obtenidas en presencia y ausencia de cofactor y de los confórmeros generados tras su adaptación a la rec-PrP CerviDel y su readaptación al sustrato de origen.

Confórmero seleccionado	Potencial cepa	Adaptación	Confórmero adaptado	Potencial cepa	Readaptación	Confórmero readaptado	Potencial cepa
Cor-Dx-A	$\alpha 0(-)$	Q226Q → CerviDel	CerviDel-Cor-Dx-A	$\tau 1(-)$	CerviDel → Q226Q	Cor-CerviDel-Cor-Dx-A	$\phi 1(-)$
Cor-Dx-B	$\alpha 0(-)$		CerviDel-Cor-Dx-B	$\tau 1(-)$		Cor-CerviDel-Cor-Dx-B	$\phi 1(-)$
Cor-Dx-C	$\alpha 0(-)$		CerviDel-Cor-Dx-C	$\tau 1(-)$		Cor-CerviDel-Cor-Dx-C	$\phi 1(-)$
Cor-Dx-D	$\beta 1(+)$		CerviDel-Cor-Dx-D	$\tau 1(-)$		Cor-CerviDel-Cor-Dx-D	$\phi 1(-)$
Cor-CB	$\epsilon 1(-)$	Q226E → CerviDel	CerviDel-Cor-CB	$\upsilon 1(-)$	CerviDel → Q226E	Cor-CerviDel-Cor-CB	$\chi 1(-)$
Uap-Dx-A	$\beta 1(+)$		CerviDel-Uap-Dx-A	$\tau 1(-)$		Uap-CerviDel-Uap-Dx-A	$\phi 1(-)$
Uap-Dx-B	$\beta 1(+)$		CerviDel-Uap-Dx-B	$\tau 1(-)$		Uap-CerviDel-Uap-Dx-B	$\phi 1(-)$
Uap-Dx-C	$\beta 1(+)$		CerviDel-Uap-Dx-C	$\tau 1(-)$		Uap-CerviDel-Uap-Dx-C	$\phi 1(-)$
Uap-Dx-D	$\beta 1(+)$		CerviDel-Uap-Dx-D	$\tau 1(-)$		Uap-CerviDel-Uap-Dx-D	$\phi 1(-)$
Uap-CB	$\delta 1(-)$		CerviDel-Uap-CB	$\upsilon 1(+)$		Uap-CerviDel-Uap-CB	$\chi 1(-)$

Cada confórmero se clasificó como una potencial cepa en función de las propiedades bioquímicas evaluadas mediante el panel de caracterización. El nombre de cada potencial cepa se compone de tres caracteres que resumen las siguientes propiedades de cada confórmero:

- La letra del alfabeto griego representa el patrón electroforético presentado por el confórmero.
- Los valores numéricos 0 o 1 hacen referencia a la ausencia o presencia de barrera de transmisión a oveja ARQ, respectivamente.
- El signo positivo, (+), o negativo, (-), se correlaciona con la capacidad del confórmero de ser detectado o no, respectivamente, por el anticuerpo 12B2.

Todas las potenciales cepas de corzo y uapití generadas en presencia de cofactor evolucionaron hacia la misma potencial cepa, $\tau 1(-)$, al ser adaptadas a la rec-PrP CerviDel. Al ser readaptadas sus sustratos de origen, no recuperaron sus propiedades bioquímicas originales, sino que dieron lugar a la potencial $\phi 1(-)$. Tanto $\tau 1(-)$ como $\phi 1(-)$ se caracterizan por patrones electroforéticos muy diferentes a los observados en priones recombinantes *bona fide*, lo que sugiere una arquitectura diferente en la estructura proteica, posiblemente debida a una interacción o ausencia de interacción de la proteína con el dextrano sulfatado causada por la delección del extremo C- terminal. Por otra parte, las potenciales cepas de corzo y uapití generadas sin cofactor también evolucionaron, primero a $\upsilon 1(-)$ y $\upsilon 1(+)$, respectivamente, al ser adaptadas a la rec-PrP CerviDel, y luego a $\chi 1(-)$, al ser readaptadas a su sustrato de origen. En esta ocasión tanto υ como χ eran patrones electroforéticos similares a los observados en priones recombinantes *bona fide*.

Tal y como era de esperar por las características concretas derivadas de la delección de la rec-PrP CerviDel, las potenciales cepas obtenidas fueron diferentes de las generadas en procesos de malplegamiento espontáneo *in vitro* de variantes polimórficas de la PrP de cérvido o de la adaptación de estas a la rec-PrP de corzo. Sin embargo, la caracterización de los confórmeros generados muestra cómo, en ausencia del extremo C-terminal y del efecto determinante del residuo 226, la transmisión de los confórmeros de corzo y uapití a la rec-PrP CerviDel resulta en una convergencia de cepas aparentemente definida por la presencia o ausencia de cofactor. Esta convergencia de cepas diferencial en función de la presencia o ausencia de cofactor podría sugerir, por tanto, otras interacciones potenciales entre el dextrano sulfatado y la rec-PrP además de las que podrían darse con el extremo C- terminal y, en particular, el residuo 226.

7.2.- Efecto del extremo C-terminal de la PrP de cérvido en el malplegamiento espontáneo *in vitro* y en la evolución de sus características

RESULTADOS

La segunda aproximación al estudio del efecto en la generación de cepas de la rec-PrP CerviDel se basó en el malplegamiento espontáneo *in vitro* de esta proteína en presencia y ausencia de dextrano sulfatado, su adaptación a las secuencias aminoacídicas de corzo y uapití y su readaptación a la rec-PrP CerviDel, incluyendo la caracterización bioquímica de todos los confórmeros generados (Figura 34a). El malplegamiento espontáneo *in vitro* de esta proteína se llevó a cabo siguiendo el protocolo de pases seriados de PMSA de 24 horas sin semilla inicial utilizando esferas de vidrio en presencia y ausencia de cofactor. En el caso de la PMSA en presencia de dextrano sulfatado, dos de las cuatro réplicas técnicas sometidas al protocolo descrito fueron positivas para rec-PrP^{res}, con idéntico patrón electroforético, mediante análisis por digestión con PK, electroforesis y tinción de proteína total tras cuatro rondas seriadas de PMSA, mientras que, en el caso de la PMSA en ausencia de cofactor, únicamente una réplica de cuatro fue positiva, también tras la cuarta ronda seriada de PMSA. Una de las dos réplicas positivas para rec-PrP^{res} obtenidas en presencia de cofactor y la única positiva en ausencia de cofactor fueron estabilizadas y adsorbidas a esferas de zirconio-sílice, con las que se llevaron a cabo las adaptaciones a las secuencias aminoacídicas de corzo y uapití. Estos procesos de adaptación, junto con los de readaptación a rec-PrP CerviDel, se llevaron a cabo mediante dos rondas seriadas de PMSA de 6 horas cada una utilizando como semillas esferas de zirconio-sílice con rec-PrP^{res} adsorbida, con una tercera ronda de adsorción y saturación de los de la superficie de esferas de zirconio-sílice con los confórmeros generados. El resultado de los procesos de malplegamiento espontáneo *in vitro*, de adaptación la rec-PrP de corzo y uapití y de readaptación a rec-PrP CerviDel se muestra en la figura 34b. En ella se observa cómo los patrones de movilidad electroforética de los confórmeros obtenidos mediante malplegamiento espontáneo *in vitro* son iguales independientemente de la ausencia o presencia de cofactor y, tras producir patrones electroforéticos variados al ser adaptados a las rec-PrP de corzo y uapití, recuperan sus patrones originales al ser readaptados a la secuencia aminoacídica de la rec-PrP CerviDel.

RESULTADOS

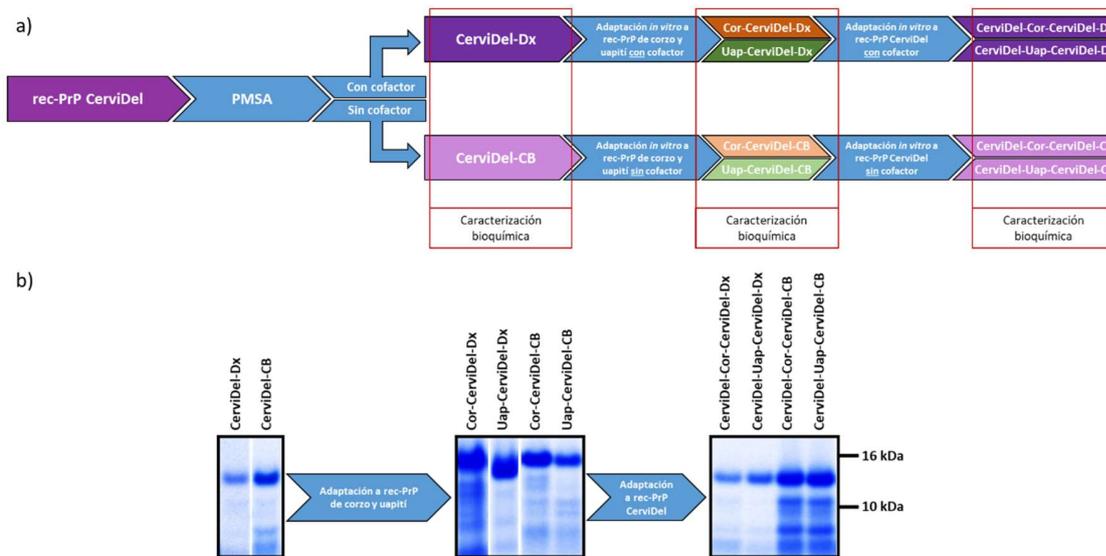


Figura 34. Efecto del extremo C-terminal de la PrP de cervido en el malplegamiento espontáneo *in vitro* y en la evolución de sus características bioquímicas. a) Flujo de trabajo esquemático de la evaluación del efecto de una deleción en el extremo C- terminal de la PrP en el malplegamiento espontáneo *in vitro* y en la evolución de las características bioquímicas de los confórmers generados al adaptarse a las rec-PrP de corzo y uapití y readaptarse a la rec-PrP CerviDel. b) Adaptación de las semillas recombinante de CerviDel a sustrato con rec-PrP de corzo y uapití y readaptación al sustrato de origen. Los procesos de adaptación y readaptación se llevaron a cabo mediante dos rondas seriadas de PMSA de 6 horas cada una utilizando esferas de zirconio-sílice con rec-PrP^{res} adsorbidas a su superficie como semilla. Se llevó a cabo una tercera ronda de adsorción y saturación de los nuevos confórmers de rec-PrP^{res} a la superficie de esferas de zirconio-sílice. Los confórmers de CerviDel obtenidos por malplegamiento espontáneo *in vitro* en presencia y ausencia de dextrano mostraron modificaciones en sus patrones de movilidad electroforética al adaptarse a las rec-PrP de corzo y uapití, recuperando los patrones originales al readaptarse a la rec-PrP CerviDel.

La caracterización bioquímica de los confórmers generados permitió distinguir 5 cepas diferentes, tal y como se refleja en la tabla 12:

- La potencial cepa u1(-) fue la obtenida mediante el malplegamiento espontáneo *in vitro* de la rec-PrP CerviDel en presencia y ausencia de cofactor, así como tras la readaptación a esta misma secuencia aminoacídica después de haber sido adaptada a las rec-PrP de corzo y uapití. El hecho de que se haya generado la misma cepa independientemente de la presencia o ausencia del dextrano sulfatado refuerza la hipótesis de la interacción de este cofactor con el extremo C-terminal, de manera que el cofactor carecería de influencia en el malplegamiento espontáneo de esta rec-PrP. Cabe destacar que esta es la misma potencial cepa observada en el confórmero CerviDel-Cor-CB, lo que podría sugerir que es la cepa asociada a la secuencia de la rec-PrP CerviDel más termodinámicamente favorable y, por tanto, más frecuente.

RESULTADOS

- Las potenciales cepas $\xi 0(+)$ y $\kappa 0(+)$ se obtienen al adaptar la cepa $u 1(-)$ a las rec-PrP de corzo y uapití, respectivamente, en un entorno con dextrano sulfatado. Cabe señalar que, aunque ambos patrones electroforéticos han sido descritos en algunas variantes polimórficas de la PrP de cévido malplegadas espontáneamente *in vitro*, la combinación de las tres propiedades bioquímicas analizadas y, por tanto, la potencial cepa como tal, es inédita en ambos casos. Esto demuestra el carácter único generado en la potencial cepa $u 1(-)$ y transmitido a las rec-PrP de corzo y uapití mediante su propagación, reforzando la idea de la existencia de una interacción diferencial entre el extremo C-terminal y el cofactor.
- Por último, las potenciales cepas $\xi 0(+)$ y $\chi 1(-)$ son las generadas al adaptar la potencial cepa $u 1(-)$ a la secuencia aminoacídica de las rec-PrP de corzo y uapití, respectivamente, en un medio con ausencia de dextrano sulfatado. Mientras que $\xi 0(+)$ es una potencial cepa no descrita con anterioridad, $\chi 1(-)$ ha sido observada en un caso previo. Este caso es el de los confórmeros Cor-CerviDel-Cor-CB y Uap-CerviDel-Uap-CB, es decir, las semillas de corzo y uapití generadas en ausencia de cofactor y readaptadas a su rec-PrP de origen tras haber sido adaptadas a la rec-PrP CerviDel.

Tabla 12. Caracterización bioquímica *in vitro* de las semillas recombinantes de CerviDel obtenidas en presencia y ausencia de cofactor y de los confórmeros generados tras su adaptación a las rec-PrP de corzo y uapití y su readaptación al sustrato de origen.

Confórmero seleccionado	Potencial cepa	Adaptación	Confórmero adaptado	Potencial cepa	Readaptación	Confórmero readaptado	Potencial cepa
CerviDel-Dx	$u 1(-)$	CerviDel \rightarrow Q226Q	Cor-CerviDel-Dx	$\xi 0(+)$	Q226Q \rightarrow CerviDel	CerviDel-Cor-CerviDel-Dx	$u 1(-)$
		CerviDel \rightarrow Q226E	Uap-CerviDel-Dx	$\kappa 0(+)$	Q226E \rightarrow CerviDel	CerviDel-Uap-CerviDel-Dx	$u 1(-)$
CerviDel-CB	$u 1(-)$	CerviDel \rightarrow Q226Q	Cor-CerviDel-CB	$\xi 1(+)$	Q226Q \rightarrow CerviDel	CerviDel-Cor-CerviDel-CB	$u 1(-)$
		CerviDel \rightarrow Q226E	Uap-CerviDel-CB	$\chi 1(-)$	Q226E \rightarrow CerviDel	CerviDel-Uap-CerviDel-CB	$u 1(-)$

Cada confórmero se clasificó como una potencial cepa en función de las propiedades bioquímicas evaluadas mediante el panel de caracterización. El nombre de cada potencial cepa se compone de tres caracteres que resumen las siguientes propiedades de cada confórmero:

- La letra del alfabeto griego representa el patrón electroforético presentado por el confórmero.
- Los valores numéricos 0 o 1 hacen referencia a la ausencia o presencia de barrera de transmisión a oveja ARQ, respectivamente.
- El signo positivo, (+), o negativo, (-), se correlaciona con la capacidad del confórmero de ser detectado o no, respectivamente, por el anticuerpo 12B2.

A pesar de que las potenciales cepas generadas mediante el malplegamiento espontáneo *in vitro* de la rec-PrP CerviDel eran coincidentes con las obtenidas tras su readaptación al sustrato de origen, su adaptación a los sustratos con rec-PrP de corzo y uapití dio lugar a potenciales cepas diferentes. Esto pone de manifiesto la importancia del extremo C-terminal en general y del residuo 226 en particular de la PrP de cévido en la modulación de las características de cepa.

De esta manera, los resultados expuestos sugieren una relación entre la tendencia convergente de la evolución de cepas priónicas tras su adaptación a diferentes secuencias aminoacídicas con el extremo C-terminal de dichas secuencias. Además, esta convergencia está aparentemente dirigida hacia unas cepas concretas u otras en función de la secuencia concreta de esta región de la proteína priónica y,

RESULTADOS

en el caso de las rec-PrP de cévido, del residuo 226. Asimismo, en lo respectivo al fenómeno de emergencia y evolución de cepa, queda patente la importancia no solo de la semilla y sus características de cepa, sino también de las propiedades y la secuencia aminoacídica de la PrP que actúa como sustrato del evento de malplegamiento.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La EDC de cérvidos es una enfermedad presente en 21 estados de los Estados Unidos de América (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), actualizado en octubre de 2016) y a dos provincias de Canadá (Saskatchewan y Alberta) (Canadian Food Inspection Agency, 2017). Además, debido a la importación de animales infectados desde Canadá, se han encontrado poblaciones de cérvidos en cautividad con esta enfermedad en Corea del Sur (Canadian Food Inspection Agency, 2017). En abril de 2016, se detectó el primer caso de EDC en renos salvajes en Noruega y, dos meses más tarde, en junio de 2016, en dos alces en este mismo país (The Norwegian Veterinary Institute 2017). Esta reciente aparición de los primeros casos de EDC en Europa ha disparado las alarmas en los distintos departamentos de Salud Pública debido a la posibilidad de una crisis similar a la acaecida en la década de los 90 con la enfermedad de las vacas locas en Reino Unido. Por ello, es de vital importancia estudiar la posible emergencia de nuevas cepas de priones en cérvidos, teniendo en cuenta la variedad de polimorfismos que presentan en su PrP y el potencial efecto de las mismas en la generación de nuevos priones y en su evolución a través de la transmisión heteróloga. Dada la gran diversidad de variantes polimórficas, los métodos de obtención y propagación de priones *in vitro* basados en el uso de proteínas del prion recombinante suponen el mejor modelo disponible para el estudio sistemático de la emergencia de priones de manera espontánea y los cambios que podrían sufrir mediante la transmisión a hospedadores con PrP con distintas secuencias.

El desarrollo de la PMSA como sistema de propagación *in vitro* basado en el uso de proteína recombinante sometida a agitación (383), supuso un mejor control de los parámetros de operación, lo que aumenta la consistencia de los resultados obtenidos, erigiéndose como una herramienta de enorme valor. Su uso para testar compuestos con posible actividad anti-priónica (385, 386) o para evaluar distintos métodos de descontaminación (387), demuestran su gran versatilidad y permiten entrever el potencial que atesora la técnica. Esta tesis doctoral se ha basado precisamente en el uso de la PMSA para la generación espontánea de nuevos priones recombinantes, persiguiendo un conocimiento más completo del evento de malplegamiento espontáneo mediante la generación de las herramientas necesarias para modelarlo *in vitro*. Con ese objetivo principal y, teniendo en cuenta que la heterogeneidad observada en las cepas priónicas sugería la posibilidad de obtener variantes estructurales de la PrP fruto de varios tipos de malplegamiento, se incluyó un análisis bioquímico y biológico detallado de los priones generados espontáneamente en busca de posibles cepas recombinantes. La obtención *in vitro* de manera rápida y robusta de diferentes priones recombinantes que presenten las características de un prion *bona fide*, supondría un avance notorio en el campo, facilitando modelos para estudios estructurales y mecánicos y permitiendo a través de una técnica robusta y fácil de implementar, una mejor comprensión de los

DISCUSIÓN

mecanismos moleculares que rigen la conversión de la PrP y que hasta el momento, permanecen desconocidos.

La experiencia de este laboratorio en la generación espontánea de priones recombinantes comenzó con el uso de la proteína priónica del topillo rojo (*Bank vole*), debido a la susceptibilidad que presenta esta especie tanto a la infección por priones exógenos (340), como para desarrollar una prionopatía en modelos transgénicos (96). Estos primeros ensayos por parte del laboratorio consiguieron de manera exitosa la obtención de priones espontáneos basados en la rec-PrP del topillo rojo (resultados pendientes de publicación), por lo que a continuación quisimos determinar si esa misma metodología podía aplicarse a secuencias de PrP de otras especies o si estaba limitada al topillo rojo por su gran tendencia al malplegamiento. Los primeros ensayos de generación espontánea mediante PMSA con las rec-PrP de cérvidos no resultaron tan exitosos como con la proteína del topillo rojo. Para mejorar la eficiencia de malplegamiento espontáneo de esta proteína fue necesario modificar la metodología inicial, realizando cambios en el volumen de experimentación y en las partículas esféricas utilizadas. La presencia de partículas esféricas de entre 0.5 mm y 1.0 mm de diámetro han demostrado mejorar la propagación *in vitro* de priones, tanto en la técnica de PMCA (411-413) como en la de PMSA (383, 387). Sin embargo, los estudios preliminares realizados en este laboratorio señalaron que partículas con un diámetro menor facilitan la generación espontánea de rec-PrP^{res}, observando también que las partículas de vidrio eran más eficientes que las de otros materiales. Estas diferencias en los materiales respecto a la adsorción de rec-PrP y al comportamiento ante priones recombinantes ya ha sido reportada en la propagación en PMSA (387). De esta manera, las partículas esféricas de vidrio de entre 0.1 y 0.2 mm fueron seleccionadas para la generación espontánea de priones recombinantes murinos, tras detectar experimentalmente que facilitaban el malplegamiento espontáneo de distintas PrP recombinantes (resultados pendientes de publicación). Estas observaciones fueron puramente empíricas y en el momento en el que se redacta esta tesis doctoral, se desconocen los mecanismos que conducen a que ciertos materiales favorezcan procesos de malplegamiento espontáneo en la rec-PrP. Una posible explicación estaría relacionada con las cargas negativas presentes en cualquier superficie compuesta de vidrio en solución acuosa, posiblemente favoreciendo la aparición de interacciones electrostáticas con la PrP. Se ha reportado en varias ocasiones que el uso de polianiones cargados negativamente estimula la conversión *in vitro* de PrP a PrP^{res} (381), incluyendo el dextrano sulfatado presente en los sustratos utilizados (377), encontrando también algún ejemplo de propagación *in vivo* (414). Sin embargo, también se han detectado efectos similares con la adición de moléculas sin carga neta (382) o incluso de cationes como el Mn⁺² (415). Otra explicación podría residir en el menor tamaño de las partículas esféricas utilizadas; la agitación mediante PMSA de partículas

DISCUSIÓN

esféricas de 0.1-0.2 mm de diámetro podría causar un incremento de energía que facilitaría la formación de PrP^{res}. Uno de los primeros modelos propuestos se basaba en que ambas formas de la PrP se encontraban separadas por una barrera energética y que la transformación directa de PrP^C a PrP^{Sc} es un evento termodinámicamente desfavorecido (256). La vibración generada por las partículas de vidrio, moviéndose en un espacio mayor que el disponible en los tubos utilizados en los primeros intentos de generar espontáneamente rec-PrP^{res}, podría ocasionar la superación de dicha barrera energética y permitir el paso de rec-PrP a rec-PrP^{res}. Independientemente del mecanismo molecular responsable de favorecer el malplegamiento espontáneo en presencia de partículas esféricas de vidrio de 0.1-0.2 mm, los resultados obtenidos con esta nueva metodología fueron satisfactorios para las proteínas recombinantes de corzo y uapití. La aparición de formas resistentes a proteasa desde la primera ronda de PMSA, despejan prácticamente toda duda acerca de posibles contaminaciones con PrP^{Sc} exógenas que propicien el malplegamiento de la rec-PrP presente en los sustratos utilizados. Además, el uso de la agitación frente a la sonicación evita los picos de altas temperaturas proporcionando energía de manera más homogénea y disminuyendo la variabilidad experimental de esta técnica (5), lo que nos llevó a seleccionar la PMSA en estas condiciones como herramienta para la generación de priones recombinantes de cérvidos.

Mientras el malplegamiento proteico en las EET de origen genético y adquirido pueden llegar a comprenderse de forma intuitiva, el malplegamiento espontáneo que lleva a la aparición esporádica de una prionopatía es un tema completamente desconocido, aunque de gran interés para la comunidad científica, ya que suponen la gran mayoría de los casos de EET diagnosticados en humanos (126). Dentro de este grupo de enfermedades destaca el CJD esporádico (sCJD), síndrome caracterizado a nivel clínico por una rápida y progresiva demencia que alterna con mioclonías generalmente, además de presentar otros síntomas motores. La amplia horquilla de edad de aparición de los síntomas, sumado a la rapidez y letalidad de la enfermedad, dificultan el estudio de su etiología (127). Por otra parte, se han detectado numerosas formas atípicas de sCJD a lo largo de la historia, la amplia heterogeneidad clínica que caracteriza la forma esporádica del CJD (416, 417), dificultando enormemente la clasificación completa de todos los posibles subtipos asociados a ella (128). Por ese motivo, además de las características clínicas estas clasificaciones atienden a aspectos moleculares de la PrP, como las diferentes intensidades en el patrón de glicosilación de la PrP^{Sc}, la distinta resistencia al tratamiento con proteasas o el aminoácido que ocupa la posición 129 de la PrP. Algunos autores defienden que una correcta clasificación molecular de las enfermedades priónicas tendría importantes implicaciones epidemiológicas que podrían ayudar, no sólo a correlacionar las características fenotípicas con los distintos confórmeros de PrP^{Sc}, sino también a esclarecer la etiología de la variante esporádica de la enfermedad, posibilitando la asociación entre

DISCUSIÓN

variables ambientales y distintas cepas priónicas (127). No obstante, todas estas clasificaciones se basaron en datos recopilados a través de aislados procedentes de pacientes que sufrieron CJD, lo que supone una limitación debido al bajo número de muestras de estudio y resultan además una constante fuente de heterogeneidad.

Debido a estas limitaciones, el estudio *in vivo* del evento de malplegamiento espontáneo se limitó al uso de animales transgénicos que portaban mutaciones en su gen *PRNP* o que expresaban la PrP^C desencadenando una neuropatía espontánea (418). Ninguno de estos casos conseguía emular de manera fidedigna la conversión espontánea de la PrP^C en PrP^{Sc} o la amplia heterogeneidad subyacente a este evento, lo que llevó al uso de PrP recombinante para tratar de reproducir y estudiar dichas características. La generación espontánea de priones sintéticos *bona fide* ha sido un objetivo perseguido en el campo de los priones prácticamente desde que se conoció la naturaleza exclusivamente proteica de este agente (60). Desde entonces, numerosos grupos de investigación han intentado con mayor o menor éxito, la producción *in vitro* de priones a partir de PrP recombinantes. Sin embargo, aunque gran parte de ellos obtuvieron proteínas malplegadas que no resultaron infecciosas *in vivo*, algunos de estos primeros productos sí consiguieron inducir una enfermedad priónica en un modelo animal, con la desventaja de presentar periodos de incubación extremadamente largos o de la inducción de la enfermedad únicamente en modelos animales que sobreexpresaban PrP^C (104, 208). En otros casos, las proteínas malplegadas *in vitro* de manera espontánea eran autopropagables, presentaban resistencia al tratamiento con proteasas, pero no eran capaces de infectar un modelo animal silvestre en una primera inoculación, no pudiendo ser considerados priones *bona fide* (105). Aunque en la pasada década se obtuvo mediante PMCA el primer prion recombinante capaz de inducir una EET en ratones silvestres con periodos de incubación similares a los de las cepas clásicas (106), este evento no ha sido reproducible de forma consistente por parte de otros grupos de investigación en más de diez años, obteniendo proteínas malplegadas recombinantes *de novo* con determinadas características de los priones, pero no infecciosos (419). Esta metodología de generación espontánea de priones recombinantes *bona fide* resultó ser compleja y altamente variable, haciendo que la obtención de priones *bona fide* fuera un suceso prácticamente azaroso y de muy baja frecuencia, lo que ha hecho que la generación espontánea de priones *in vitro* continúe siendo uno de los temas de interés en el campo. Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral vendrían a resolver este inconveniente, puesto que gracias a la herramienta PMSA, se obtienen priones sintéticos *de novo* de manera rápida y consistente, permitiendo un estudio sistemático de sus propiedades y del evento de malplegamiento.

DISCUSIÓN

A la dificultad de mimetizar *in vitro* el malplegamiento espontáneo se le suma el hecho de reproducir la heterogeneidad observada en el sCJD, que podría ser fruto de la existencia de diferentes formas de malplegamiento que originan confórmers ligeramente diferentes o llevan a la aparición de cuasi-especies y sub-cepas (275). Desde que la transmisibilidad de las enfermedades priónicas se demostró en ovejas (8), se sucedieron los experimentos para demostrar dicha característica en otras especies (29, 420, 421). Fruto de uno de esos ensayos, se detectó por primera vez la presencia de dos cepas priónicas diferentes en cabras de experimentación inoculadas con un mismo aislado de scrapie ovino. Estas dos cepas, *scratching* y *drowsy* en inglés (43), fueron las primeras descritas en el campo de los priones y abrieron la puerta a numerosos estudios destinados a comprender el fenómeno de cepa y la adquisición de diferentes propiedades por priones con la misma secuencia aminoacídica. Aunque la caracterización final de las propiedades de una cepa solo puede realizarse a través de un bioensayo, el uso de herramientas *in vitro* facilita enormemente su estudio, permitiendo un cribado de las posibles cepas atendiendo a sus propiedades bioquímicas distintivas. El grupo de Byron Caughey fue pionero en este aspecto, diseñando una herramienta denominada “ensayo libre de células” que les permitió malplegar PrP^C purificada de cerebro *in vitro*, por inducción de priones de hámster de origen encefálico y manteniendo algunas de las características de dicha cepa clásica de hámster (112). Posteriormente, la PMCA también demostró ser capaz de reproducir las características de cepa en sus productos amplificados *in vitro* a partir de PrP^C proveniente de encéfalo (103). Esta herramienta resultó muy útil para estudiar propiedades de priones *in vitro* como su habilidad para superar barreras de transmisión (344), aunque en ocasiones permitió rebasar ciertas barreras que nunca pudieron superarse *in vivo* (375), lo que conduce a la necesidad de otros estudios que complementen y permitan una mejor comprensión de las propiedades de cepa y su potencial transmisibilidad. Además, la PMCA resulta en una alta variabilidad probablemente por la dificultad de controlar todos los parámetros de operación (422), lo que supone un problema a la hora de obtener priones recombinantes espontáneos de forma consistente. Por el contrario, como se ha demostrado en los resultados de esta tesis doctoral, es posible generar diferentes cepas de priones recombinantes y mantener sus propiedades tras pases seriados de PMSA. La mayor simplicidad de la técnica y la presencia controlada de un único cofactor en el medio de reacción permite reducir la variabilidad de los resultados, ofreciendo un entorno más homogéneo que el de la PMCA, en que tradicionalmente se han utilizado homogeneizados de encéfalo, y permitiendo la propagación estable de cepas y una correcta caracterización de sus propiedades.

A lo largo de los diferentes ensayos de malplegamiento espontáneo realizados con sustratos de corzo y uapití detectamos diferencias en los perfiles de movilidad electroforética de las rec-PrP^{res}

DISCUSIÓN

obtenidas. Resultó llamativo el hecho de que observamos distintos patrones de peso molecular en las rec-PrP^{res} generadas con sustratos que presentaban otros aminoácidos, lo que sugiere que favorecen la variabilidad estructural. Identificamos diferentes patrones de peso molecular tras la digestión con proteasa mediante tinción de proteína total en las rec-PrP^{res} de cérvidos generadas, independientemente de si fueron producidas siguiendo distintas estrategias de PMSA, lo que no resultó sorprendente dado que ya se ha reportado la generación de distintos confórmeros en PMCA a pesar de utilizar condiciones idénticas (106, 419, 423). Además de las condiciones variables de PMSA, el hecho de que algunas formas de rec-PrP^{res} se detectaran tras varios pases seriados de PMSA, mientras que otras únicamente necesitaban 24 h, supuso otro factor diferencial que podría explicar la variabilidad observada en los patrones de peso molecular. Al ser observadas mediante tinción de proteína total tras su digestión con PK y electroforesis, todas estas formas presentaron una banda de entre 15 y 16 kDa típica de los priones *bona fide* (denominada como ~16 kDa a lo largo de esta tesis doctoral), similar a la observada en priones recombinantes infecciosos de topillo rojo propagados mediante PMSA (383). Aunque presenten un patrón similar, no descartamos que fuesen distintos confórmeros, ya que algunos autores han reportado la formación de fibras amiloides de rec-PrP^{res} con distintas propiedades originadas a partir de la misma secuencia de PrP, sometida a distintas condiciones de agitación, a pesar de su aparente similitud bioquímica (207). Estas diferencias en la forma de generación y el perfil electroforético nos condujeron a tratar estas proteínas malplegadas de cérvidos como confórmeros bioquímicamente distintos. En la introducción de esta tesis doctoral definimos el concepto de prion *bona fide* para denominar a aquellas PrP recombinantes malplegadas *in vitro* que se comportan como un prion clásico y que son resistentes a proteasas, autopropagativos y capaces de inducir una EET *in vivo*. En este punto, no podíamos afirmar estar ante cuatro priones *bona fide* diferentes, por lo que nos referimos a estas formas malplegadas como confórmeros distintos de rec-PrP^{res}, ya que se han reportado casos de generación de amiloides ricos en láminas β , resistentes a proteasas y capaces de propagarse, pero con baja o nula capacidad infectiva (424). Sin embargo, no descartamos la posibilidad de que fuesen cepas de priones diferentes con propiedades bioquímicas y biológicas únicas, por lo que las seleccionamos y tratamos de manera independiente.

Con el objetivo de indagar en esas leves diferencias que pueden reflejar los distintos malplegamientos de la PrP, realizamos una caracterización bioquímica de algunas de las propiedades típicamente estudiadas en el campo de los priones. Para ello, utilizamos la polivalente técnica de la PMSA en diferentes condiciones y como sujetos de la caracterización, los confórmeros de rec-PrP^{res} de cérvidos adheridos a partículas de zirconia – sílice (387). Recientemente, este laboratorio ha podido observar que las partículas de este material facilitan el evento de propagación en presencia de una semilla de rec-PrP^{res},

DISCUSIÓN

minimizando los eventos de malplegamiento espontáneo en ausencia de semilla. De esta manera, la adhesión de los confórmeros a este tipo de partículas constituye un método ideal para estandarizar la cantidad de inóculo utilizado en cada ensayo, minimizar la contaminación con PrP^{Sc} exógena, evitar la aparición de formas malplegadas espontáneas y realizar comparaciones más realistas entre los resultados obtenidos para las características de cada confórmero.

Esta caracterización bioquímica comenzó con el análisis de propiedades que consideramos básicas en un prion y que están relacionadas con su conversión a isoforma malplegada y su resistencia a la digestión por proteasas. Desde que existe una amplia colección de anticuerpos capaces de mapear diferentes epítomos de la PrP (216), se han sucedido investigaciones que han aplicado esta metodología para diferentes propósitos. Algunos de estos estudios trataron de aportar información estructural, identificando regiones de la PrP más accesibles a anticuerpos que otras(215), mientras que otros grupos utilizaron el mapeo epitópico para identificar distintas cepas de priones en función de los fragmentos diferentes obtenidos tras la digestión con proteasas que resultan de conformaciones tridimensionales distintas, obteniendo éxito a la hora de distinguirlas bioquímicamente partiendo directamente de aislados de cabras inoculadas con distintas cepas de scrapie (425). Esta metodología también ha sido aplicada a productos obtenidos tras una propagación *in vitro*, como en los intentos por distinguir los diferentes tipos de sCJD mediante la técnica de RT-QuIC. Utilizando aislados cerebrales y líquido cefalorraquídeo de pacientes con sCJD como semilla de la reacción *in vitro*, no fue posible diferenciar los subtipos de la enfermedad tras la amplificación con RT-QuIC, aunque se detectaron ligeras variaciones gracias al mapeo epitópico (426). Pese a que la diferenciación de cepas priónicas mediante RT-QuIC es posible, no es el mejor método para alcanzar este objetivo. A diferencia de la PMCA, donde los priones propagan manteniendo las características de cepa y por tanto pueden rastrearse los patrones de glicosilación de las diferentes cepas por ejemplo; el RT-QuIC, que da lugar a amiloides no infecciosos generalmente, sin propagar de forma fidedigna el prion de origen, únicamente monitoriza la formación de amiloides atendiendo a la fluorescencia emitida por la Tioflavina T (ThT, del inglés *Thioflavine T*), proporcionando muy poca información sobre las características bioquímicas de los potenciales confórmeros distintos (427). A pesar de su innegable valor como técnica diagnóstica, las características de los productos resultantes de QuIC, limitan su aplicación para otros usos como el estudio de mecanismos moleculares del malplegamiento, para lo que la PMSA, dada su capacidad de dar lugar a priones infecciosos *in vivo* de forma consistente es idónea (383, 428).

DISCUSIÓN

Los ensayos de propagación *in vitro* utilizando sustratos no homólogos a las semillas recombinantes de origen resultaron un mejor filtro para la observación de diferencias. Así, en una simulación de las barreras de transmisión que podrían observarse *in vivo*, utilizamos sustratos con diferentes rec-PrP o con ausencia de cofactor para evaluar el efecto sobre la propagación en sustratos no homólogos. En cualquier caso, la capacidad diferencial de algunas de las semillas para inducir el malplegamiento de rec-PrP no homólogas en las condiciones del ensayo supuso una evidencia adicional de diferencias conformacionales, dado que la capacidad de superar determinadas barreras polimórficas o interespecíficas es una característica intrínseca de cepa que parece depender de la interacción entre la estructura de la semilla y la capacidad de la PrP no homóloga para adaptarse a la misma (429). Además, tal y como se ha reportado tanto *in vivo* como *in vitro*, la transmisión interespecífica de priones es una fuente de diversidad de cepa (430), ya que mediante potenciales fenómenos de adaptación o selección que se discutirán más adelante, pueden dar lugar a nuevos confórmeros con características diferentes de la semilla de origen. De acuerdo con esta observación, los productos de PMSA resultantes de la propagación de las semillas en sustratos no homólogos mostraron una alteración en su patrón de movilidad electroforética tras la digestión con proteasa. Lamentablemente, los productos resultantes mostraron patrones indistinguibles entre sí, lo que no permitió confirmar si las diferencias sugeridas por las pruebas bioquímicas previas podrían haberse transmitido a través de la barrera o si las posibles diferencias se habían reducido al converger todas hacia una misma conformación por efecto de la rec-PrP no homóloga del sustrato. Aunque en el caso de la PMCA, se ha demostrado una gran fidelidad en la reproducción de las características de cepa y las barreras de transmisión (344-346), aún no hay evidencias de ello para la PMSA, por lo que a pesar de que resulta un ensayo útil para determinar diferencias entre semillas o incluso para obtener priones recombinantes para aquellas PrP que no puedan malplegar espontáneamente *in vitro*, su utilidad para evaluar la potencial transmisibilidad interespecies es aún limitada y requiere de bioensayos para su validación (383). En cuanto al uso de sustratos homólogos en secuencia a las semillas de experimentación, pero con ausencia de cofactor, los resultados también revelaron la utilidad de esta estrategia para diferenciar entre confórmeros. El efecto de los cofactores en la propagación priónica ha sido ampliamente estudiado, incluso ha sido aprovechado para diferenciar entre cepas *in vitro* mediante PMCA (431). Sin embargo, el significado biológico que supone la presencia o ausencia de cofactores y su relación con las propiedades que adquieren los priones sigue siendo un tema de controversia en el campo de la investigación priónica. Debido a esta complejidad, en un principio decidimos utilizar los resultados de la propagación en ausencia de dextrano únicamente como método discriminatorio entre confórmeros. No obstante, observamos una alteración muy particular en el patrón

DISCUSIÓN

de movilidad electroforética del producto inoculado con priones de corzo, por lo que tras comprobar la naturaleza *bona fide* de los priones recombinantes generados espontáneamente, decidimos indagar en cómo afecta el cofactor a las propiedades de estos confórmeros. Así, a pesar de no ser el objetivo de este ensayo, esta circunstancia supuso una oportunidad para profundizar en la influencia de los cofactores en las características de cepa, que se discutirán más adelante.

La variedad de cepas obtenida al utilizar proteínas recombinantes de cérvidos era un resultado deseable, dado que provee de modelos con gran potencial para ahondar en el estudio de los mecanismos moleculares que determinan las características de cepa. Sin embargo, no es un hecho completamente inesperado ya que la capacidad de una única secuencia de PrP de dar lugar a múltiples confórmeros incluso en condiciones aparentemente iguales, tanto *in vivo* (315) como *in vitro* es de sobra conocida, aunque parece infrecuente en este último caso (106, 419). Esta heterogeneidad en la generación espontánea de proteínas malplegadas *in vitro* también ha sido previamente detectada por este grupo de investigación al utilizar proteína recombinante de topillo rojo (resultados pendientes de publicación). Como los mecanismos moleculares que determinan la formación de un confórmero u otro a partir de una misma PrP siguen siendo desconocidos, más allá de un potencial papel de determinados cofactores polianiónicos que parecen promover la formación de distintos confórmeros (106, 377, 423, 432), en este punto únicamente podemos especular sobre las razones que han resultado en tal variedad de cepas. Los resultados previos con la PrP recombinante de topillo rojo sugieren la posibilidad de que la presencia de isoleucina en la posición 109 favorezcan la variabilidad obtenida en el malplegamiento. Al utilizar en todos los casos el dextrano sulfatado como cofactor polianiónico, *a priori* podríamos descartar su influencia en la formación de distintos confórmeros, ya que de acuerdo con otros estudios los cofactores parecen dirigir el malplegamiento a determinadas conformaciones restringiendo la variabilidad (377). No obstante, es muy probable que determinados cofactores puedan favorecer más de una conformación, tal y como se ha demostrado para la combinación ARN y POPG (106, 423), siendo el dextrano sulfatado otro ejemplo. Sin embargo, la variedad de malplegamientos puede deberse simplemente a la estocasticidad, algo que también se observaba en la PMCA (433). Los procesos estocásticos aluden a magnitudes aleatorias que varían con el tiempo o que caracterizan una sucesión de variables aleatorias que evolucionan en función de otra variable externa. Este concepto matemático se opone radicalmente a la creencia de que cualquier evento de generación/selección es un proceso determinista, debate que existe sobre las formas de organización biológica desde antes de que se conociese la naturaleza del agente priónico (434). Trasladando esto a la investigación priónica, varios estudios teóricos sobre la dinámica de formación y propagación de priones respaldan la idea de que eventos estocásticos durante la polimerización o

DISCUSIÓN

fibrilización puedan ser la causa de la variabilidad de cepa, debidos a una heterogeneidad de nucleación (435, 436). Independientemente de los mecanismos moleculares que han llevado a la obtención de cuatro cepas distintas a partir de un mismo procedimiento, algunas observaciones realizadas durante la caracterización bioquímica y biológica de las semillas resultan de gran interés para el estudio del fenómeno de cepa. Pese a que todas ellas son propagables de manera estable mediante pases seriados en sustrato homólogo conservando sus propiedades, algunas alteraciones del perfil de movilidad electroforética ocurridos tras la propagación en sustratos no homólogos (distinta secuencia de rec-PrP o ausencia de cofactor) apuntan a la ocurrencia de fenómenos de selección, que podrían ser consecuencia de la adaptación de ciertos confórmeros que se encuentran en proporción minoritaria dentro de la nube de cuasi-especies que componen la muestra priónica, tal y como defienden algunos autores (275). Los cambios en las propiedades bioquímicas y biológicas de las cepas priónicas quedaron en evidencia ya con los estudios iniciales de transmisión interespecífica, cuando se observó que la inoculación de un mismo aislado de scrapie en cabras con genotipos diferentes daba lugar a dos fenotipos claramente distinguibles de enfermedad (43, 437). En ese momento, se achacaron las diferencias a los distintos genotipos de los huéspedes, sugiriendo un fenómeno de adaptación ante la propagación a expensas de una PrP no homóloga a la PrP^{Sc}. Posteriormente, se observó este fenómeno de cambio de propiedades biológicas al inocular un mismo aislado de priones de visón en hámsteres, que en este caso tenían un mismo genotipo, por lo que se planteó la posibilidad de que el aislado original contuviera una mezcla de cepas que eran seleccionadas en el nuevo hospedador (333). Así, a medida que se demostraba que las características de cepa se relacionaban con diferencias estructurales de la PrP^{Sc}, y que una determinada secuencia de PrP^C podía adoptar un espectro, probablemente limitado de conformaciones distintas de PrP^{Sc}, el debate en torno a los mecanismos moleculares que subyacen al fenómeno de cepas y los cambios observados ante barreras de transmisión se trasladó a si éstas estaban constituidas por un único clon molecular de PrP^{Sc} (un único confórmero) cuya estructura muta o se adapta en respuesta al nuevo entorno de propagación; o si en cambio, las cepas podían estar compuestas por una multitud de confórmeros de PrP^{Sc} distintas que explicaría los cambios en términos de selección de los confórmeros más aptos para la propagación en el nuevo entorno (275). Aunque estas dos posibilidades no son mutuamente excluyentes, en el sentido en el que podrían darse tanto eventos de mutación como de selección, las evidencias disponibles apuntan a que la teoría de que las cepas están realmente constituidas por una variedad de confórmeros denominados cuasi-especies o sub-cepas es más plausible, en la que tanto cambios en la PrP del sustrato como en otros componentes presentes en el entorno de propagación (como cofactores o inhibidores) podrían inducir un desplazamiento de las sub-cepas propagadas más eficientemente en las nuevas

DISCUSIÓN

condiciones que se reflejaría en un cambio de fenotipo (438). Los resultados de generación espontánea descritos a lo largo de esta tesis doctoral para las PrP recombinantes de cérvidos y los cambios observados tras su propagación en distintos entornos suponen una oportunidad sin precedentes para ahondar en el estudio de las denominadas mutaciones de cepa y para abordar si las cepas generadas contienen un único confórmero o son mezclas heterogéneas de confórmeros. Al trabajar con un solo cofactor resulta un sistema sencillo en el que procesos de selección clonal o cambios de entorno de propagación resultan fáciles de implementar y estudiar, como reflejan las pruebas de propagación en presencia y ausencia de dextrano sulfatado que se discutirán más adelante. Junto con la exhaustiva caracterización de las cepas obtenidas, la PMSA abre la puerta a estudios críticos para determinar los factores con mayor influencia en la formación de distintas cepas y su evolución, permitiendo como en este caso, estudiar el rol del dextrano sulfatado como cofactor en la formación de variabilidad conformacional.

Más allá de la relación entre la estructura primaria de la PrP y la existencia de diferentes cepas priónicas, el papel que desempeñan los cofactores merece un estudio más detallado. Sin embargo, el rol que puede desempeñar el dextrano sulfatado no ha podido ser analizado con toda la profundidad que requiere, encontrándose en la actualidad estos estudios aún en una fase embrionaria. El papel de los cofactores en el malplegamiento de la PrP recombinante *in vitro* ha sido estudiado por diversos grupos de investigación en las últimas décadas. La presencia de cofactores como el RNA (381), la fosfatidiletanolamina (382) o el dextrano (377) ha sido descrita como esencial por algunos autores para la generación de priones infecciosos (439), mientras que otros, defienden que puede favorecer la formación o selección de confórmeros de PrP con capacidad infectiva pero que no resulta esencial para la infectividad de los mismos una vez formados (377). En este sentido, existen estudios que indican que la propagación de priones es dependiente de los cofactores del sustrato solo para determinadas cepas priónicas, sugiriendo que esta barrera puede ser superada eventualmente (431, 440) y que por tanto los cofactores no son esenciales, ya que, si la dependencia fuera total, el cofactor podría ser un elemento intrínseco del prion *bona fide* sin el que este no tendría capacidad infecciosa.

No obstante, los priones generados o propagados en ausencia de cofactor hasta la fecha, han presentado tasas de ataque nulas o reducidas y en este último caso, tiempos de incubación muy prolongados (377, 439), por lo que el debate acerca del papel de los cofactores sigue activo y, por consiguiente, el análisis de la función que realiza el dextrano sulfatado en los priones de cérvido podría ser un tema de suma relevancia. Tras detectar un patrón de peso molecular muy particular en las rec-PrP^{res} formadas tras la adaptación a un medio sin cofactor de las semillas de corzo y uapití, decidimos

DISCUSIÓN

indagar más en este resultado. Estos cambios observados, además de para la distinción de las cepas, supusieron una buena oportunidad para estudiar el efecto de la presencia o ausencia de cofactor en el medio de propagación, tratando de dar respuesta a si las alteraciones estructurales podrían responder a fenómenos de adaptación y/o selección, así como para determinar si el cofactor es esencial para la infectividad de las rec-PrP^{res} generadas *in vitro*. Para comprobar si el aparente cambio estructural sufrido por estas cepas al ser propagadas en un entorno libre de cofactor supuso una modificación en sus propiedades, ya que también podría responder a alteraciones en la digestión proteolítica debidos a los distintos medios de propagación (441), realizamos experimentos de propagación en sustratos basados en PrP murina silvestre. La idea de que los cofactores podrían dirigir o favorecer la formación de PrP malplegadas infecciosas podría explicar también estudios previos, en que los productos obtenidos *in vitro* sin la presencia de cofactores polianiónicos que no causaban EET en animales en una primera inoculación, podían acabar siendo infecciosos en un segundo pase tras una adaptación *in vivo* en animales asintomáticos (105, 442). Así, estos amiloides de PrP que no reunían las características propias de un prion *bona fide* podrían haberse adaptado *in vivo* a un entorno rico en cofactores polianiónicos (443), que podría inducir un cambio hacia la formación de nuevas cepas que sí se comportarían como priones *bona fide*. Aunque este fenómeno también podría explicarse por la integración de cofactores en la estructura del prion sintético durante el primer pase, lo que les podría haber conferido capacidad infectiva para la subsiguiente inoculación *in vivo*. Estas investigaciones han conducido al establecimiento, por parte de ciertos autores, de la teoría que defiende que el cofactor es esencial para que un prion sea infeccioso (432, 439). La última aproximación de estos autores para demostrar que la misma rec-PrP malplegada no resulta infecciosa en ausencia de cofactores, pero que conserva latente la capacidad infectiva siendo necesaria únicamente su adición para la recuperación de dicha capacidad, implicó la propagación de una cepa murina infecciosa a sustratos basados en rec-PrP de topillo rojo, tanto en presencia como en ausencia de cofactores lipídicos purificados de encéfalo. Para lograr dicha adaptación realizaron 18 rondas de PMCA en las que, debido a las características particulares del sustrato de topillo rojo, es posible la generación espontánea de nuevas cepas o la promoción de otras que tengan poco o nada que ver con la semilla original, basándonos en resultados obtenidos en nuestro laboratorio (pendientes de publicación) que indican que la rec-PrP recombinante de topillo rojo puede dar lugar a priones recombinantes infecciosos en menos de 24 h de reacción de forma espontánea. De hecho, reportan que al propagar el prion recombinante murino infeccioso (106) en ausencia de cofactor en sustrato con rec-PrP de topillo rojo se observa un núcleo resistente de ~16 kDa en la rec-PrP^{res} resultante (no infecciosa *in vivo*), mientras que la propagación en presencia de cofactores dio lugar a un fragmento de ~17 kDa (infecciosa *in vivo*),

DISCUSIÓN

sugiriendo un potencial cambio de cepa o su generación espontánea durante los pases realizados. Posteriormente, la propagación de este confórmero de ~16 kDa mediante 3 pases seriados de PMSA en homogenizado de encéfalo de topillo rojo, resulta en la misma cepa que el confórmero de ~17 kDa. Dada la presencia de cofactores en el homogeneizado, resulta difícil descartar una potencial adaptación/selección de la rec-PrP^{res} de 16 kDa a la cepa representada por la banda de 17 kDa en 3 pases, pudiendo tratarse de dos confórmeros distintos y no de uno sólo cuya infectividad depende de la presencia de cofactores.

En nuestro caso, los cambios de patrón observados en las cepas adaptadas a CB, apuntan en la dirección contraria, en que los cofactores no serían esenciales para la infectividad, sino que inducirían derivas conformacionales en las cepas propagadas, ya sea por adaptación o por selección preferencial de otros confórmeros minoritarios. El hecho de que nuestras cepas sean capaces de propagar en un sustrato homólogo sin dextrano sulfatado y mantenga sus propiedades infecciosas, puede deberse simplemente a un hecho estocástico o a que los priones recombinantes generados espontáneamente mediante la PMSA son también más eficientes a la hora de superar constricciones como la ausencia de cofactor. Aunque no podemos descartar la posibilidad de que algunas cepas de priones sintéticos sí sean dependientes de cofactor para inducir una EET *in vivo*, queda demostrado que otras cepas son capaces de mantener sus propiedades infecciosas tras ser adaptadas a un ambiente sin cofactores, lo que podría suponer una reevaluación de las características que se le atribuyen a un prion *bona fide*.

Con la idea de profundizar en otra de las cuestiones más relevantes acerca de la naturaleza de las cepas priónicas, si se componen de un único confórmero o si como indican las evidencias más recientes se trata de nubes de distintos confórmeros o cuasi-especies (275, 438), decidimos continuar los estudios de propagación en presencia/ausencia de dextrano sulfatado ya que cambios en el entorno de propagación podrían ayudar a resolver dicha cuestión. Para ello, diseñamos una estrategia de pases seriados para devolver los productos adaptados a CB de nuevo a dextrano y, por último, readaptarlos a la ausencia de dextrano sulfatado, suponiendo que se revelarían potenciales fenómenos adaptación o si en cambio, podríamos observar eventos que sugiriesen mezclas de cepas en los que los cofactores podrían actuar como selectores (377). Los estudios preliminares realizados *in vitro* han dejado entrever que estas cepas podrían modificar sus propiedades a medida que intercalan la presencia de dextrano con su ausencia, lo que podría significar la obtención de mezclas heterogéneas de cepas priónicas recombinantes con distinto grado de afinidad para la propagación en ausencia o presencia de dextrano. Actualmente, estos estudios se encuentran en curso y se plantean diversas inoculaciones que podrían revelar

DISCUSIÓN

características de cepa derivadas de posibles mezclas presentes en las diferentes preparaciones, o si por el contrario las adaptaciones realizadas *in vitro* resultan en cepas completamente divergentes apuntando a fenómenos de adaptación más que de selección. En cualquier caso, y a pesar de que no se dispone de resultados aún para discutir acerca del tema, decidimos incluir los estudios de cambio de entorno de propagación para ilustrar el potencial de la PMSA.

Por último, este trabajo ofrece la oportunidad de arrojar algo de luz sobre el potencial zoonótico de los priones de cérvidos de nueva generación. La barrera de transmisión de la cepa cérvida CWD a humanos está impedida por la incompatibilidad con la PrP^C humana (444) de una forma similar a lo que ocurre con la cepa ovina scrapie en humanos (445). A pesar de que nunca se ha descrito transmisión de EDC a humanos, cabe destacar que la transmisión horizontal entre especies susceptibles a esta enfermedad puede ocurrir por numerosas vías, incluida la oral y la nasal (446). Además, la gran ubicuidad de los priones infectivos de EDC (presentes en orina, heces, saliva, sangre y astas de cérvidos en estadios clínicos y pre-clínicos de la enfermedad, así como en tejidos como el músculo esquelético, grasas, vísceras y el sistema nervioso central (447)) provoca que el riesgo de exposición a estos priones sea muy elevado, fundamentalmente en cazadores, ganaderos y consumidores de carne de venado. En el caso de Europa, es especialmente alarmante para la población Sami noruega. El pueblo Sami, indígena de Noruega y Finlandia, se caracteriza por la cría de manadas semi-salvajes de renos y alces como medio de subsistencia. Debido al consumo de carne y leche de estos animales y la posible infección de EDC de los mismos, el riesgo de exposición de esta población al agente infeccioso ha de tenerse en cuenta.

Aunque el potencial zoonótico de la EDC se considera bajo, hay que recordar el caso de la transmisión de EEB a humano que tuvo lugar en Reino Unido en 1986, provocando la aparición de los primeros casos de la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vECJ)(448). Del mismo modo que esto ocurrió con la EEB, podría darse también con la EDC. Esto se debe a que las barreras de transmisión pueden cambiar cuando una cepa priónica se adapta a otra especie. Un ejemplo de ello lo encontramos en los hámsteres sirios. Estos animales, resistentes a la EDC, pueden infectarse con dicha enfermedad a través del contacto con hurones infectados con la misma (Figura 35). Los hurones, animales susceptibles a la ECD, actúan como especie intermedia permitiendo la infección de otra inicialmente resistente, en este caso, el hámster sirio, demostrando así la capacidad de una cepa de priones para adaptarse a otras especies alterando sus características y permitiendo la infección de una tercera especie (339). De este modo, podría llegar a producirse una zoonosis de EDC a través de especies intermedias que comparten nicho con los cérvidos. Además, la posibilidad de que aparezcan nuevas cepas en cérvidos con una

DISCUSIÓN

transmisibilidad tan elevada como la EDC pero con la particular característica de afectar a un rango diferente de hospedadores tampoco puede ser descartada.

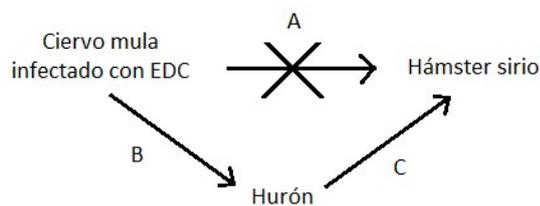


Figura 35. Transmisión de EDC a especies resistentes mediante especies intermedias. El ciervo mula infectado con EDC es incapaz de transmitir dicha enfermedad al hámster sirio (A). Mediante el pase de la EDC de ciervo mula a hurón (B) se modifica el tropismo del agente causante de la enfermedad permitiendo la infección del hámster sirio (C).

Así, dada la importancia creciente de la EDC y su posible riesgo de zoonosis, decidimos emplear la rec-PMCA para estudiar a nivel molecular los residuos que determinan la barrera de transmisión entre humanos y cérvidos. Además de estudiar los aminoácidos críticos que podrían impedir la transmisión de EDC a humanos, también se ha estudiado la barrera en la dirección opuesta, para entender mejor el fenómeno de barrera interespecies y corroborar que no está determinada exclusivamente por diferencias aminoacídicas.

De este modo, utilizando la rec-PMCA como enfoque *in vitro* para el estudio de la barrera de transmisión interespecie, hemos encontrado que las posiciones más críticas de la PrP de ciervo mula en la barrera de transmisión de la EDC de humano a cérvido, son la 171, la 173 y la 177, mientras que, en la barrera de transmisión de la EDC de cérvido a humano, las posiciones más críticas de la PrP de humano parecen ser la 112, 155, 166, 170 y 174.

La mayoría de estas posiciones forman parte del denominado lazo $\beta 2$ - $\alpha 2$, que comprende los residuos del 165 al 175 de la PrP de humano, siendo los equivalentes en la PrP de ciervo los residuos del 168 al 178. El también denominado lazo rígido (*rigid loop*), ha sido ampliamente estudiado en el área de las prionopatías, debido a su aparente implicación en la resistencia/susceptibilidad de determinadas especies a distintas cepas de priones. Este lazo puede estar bien definido (rígido), como en las PrP de cérvidos y de topillo rojo, o desordenado, como es el caso de la PrP de humano y de ratón. Así, una de las características más significativas de la PrP de cérvidos es esta rigidez del lazo $\beta 2$ - $\alpha 2$ (348) que se considera clave en la barrera de transmisión interespecie (351). De este modo, se ha demostrado que la presencia del lazo rígido en la PrP murina de ratones transgénicos cuya secuencia de PrP se había modificado introduciendo las sustituciones S170N y N174T, modula su susceptibilidad frente diferentes cepas de prión. Los animales generados mostraron una alta barrera de transmisión para cepas de priones murinas con tiempos de incubación muy elevados y significativamente superiores a los modelos murinos que no presentan un lazo rígido en la secuencia de la PrP (449, 450). Así mismo, en una serie de estudios,

DISCUSIÓN

mediante experimentos con ratones transgénicos que expresaban PrP humana con cuatro sustituciones aminoacídicas de ciervo en esta región (en las posiciones 166, 168, 170 y 174) se corroboró que dicho lazo supone una de las principales causas de la barrera interespecie para la EDC, ya que los ratones con estas sustituciones aminoacídicas en la PrP humana se infectaban de EDC mientras que los que no las tenían, no. Además, en otro experimento llevado a cabo por los mismos autores en el que introdujeron una única sustitución aminoacídica (D167S) tal que provocaba un lazo bien definido, se observó que esto no era condición suficiente para superar la barrera interespecie, es decir, para infectar de EDC a animales no susceptibles, sino que la secuencia de aminoácidos de las posiciones 165-175 del lazo, más que la estructura secundaria del mismo, era el factor que gobernaba la susceptibilidad a la enfermedad (451).

Así, los resultados obtenidos en este estudio *in vitro*, también apuntan en la misma dirección, ya que las sustituciones en las posiciones 166, 170 y 174 son los que muestran una mayor influencia en la capacidad de propagación de la EDC en sustratos que contenían PrP humana. Esto podría deberse a una importante alteración estructural causada por las sustituciones introducidas que podrían tener gran influencia en las interacciones proteína-proteína necesarias para la conversión de PrP^C a PrP^{Sc}. De hecho, estudios de simulación de dinámica molecular por RMN de la PrP de ratón determinaron que el residuo 170 es el principal determinante de la movilidad del lazo $\beta 2-\alpha 2$ y que la introducción de las mutaciones que conforman la rigidez del lazo bloquean la movilidad de esta zona de la proteína presumiblemente por la ruptura de los enlaces de hidrogeno (449, 452). Por tanto, a pesar de no causar alteraciones en la estructura global de la PrP, las sustituciones en el lazo rígido parecen alterar la conformación local, que podría ser relevante para la interacción PrP^C-PrP^{Sc}. No obstante, una limitación que presenta cualquier interpretación que trate de explicar el efecto de ciertas sustituciones aminoacídicas en el malplegamiento proteico es la de desconocer la estructura de la PrP^{Sc}. Desgraciadamente sólo se puede discutir el potencial efecto que los cambios tienen sobre la estabilidad de la PrP^C, así como impedimentos estéricos potenciales en la unión de esta proteína con la PrP^{Sc}. Se asume que algunos cambios probablemente tengan una mayor incidencia sobre la estructura de la PrP^{Sc} estabilizando o favoreciendo su malplegamiento mientras que otros pudieran generar impedimentos estéricos que hicieran más difícil su plegamiento.

Una posible explicación estructural del efecto de las sustituciones en el lazo $\beta 2-\alpha 2$ es la hipótesis de la “cremallera estérica” (*steric zipper*). Según ésta, la conversión de una PrP^C en PrP^{Sc} requiere de la interacción entre ambas, tal que segmentos de los lazos rígidos de cada una de ellas encajen entre sí formando una especie de cremallera estérica. De esta manera, diferencias existentes entre los segmentos de las dos isoformas debidas a sus características de cepa o a sus secuencias aminoacídicas, conducen a

DISCUSIÓN

choques estéricos y cavidades, evitando la adecuada interacción y, por tanto, la conversión. Así, esta hipótesis explicaría la barrera de transmisión interespecie. De acuerdo con ella, las estructuras de los segmentos de los bucles $\beta 2$ - $\alpha 2$ humano y cérvido pertenecen a diferentes clases de características estéricas no formando cierres estéricos complementarios. De este modo, los modelos de cremallera estérica de cérvido y humano son incompatibles debido, principalmente, a las diferencias aminoacídicas en las posiciones 168 y 170, ya que forman un choque estérico y una cavidad en la estructura de la cremallera, respectivamente, no permitiendo una conversión eficiente (Figura 36) (408, 451).

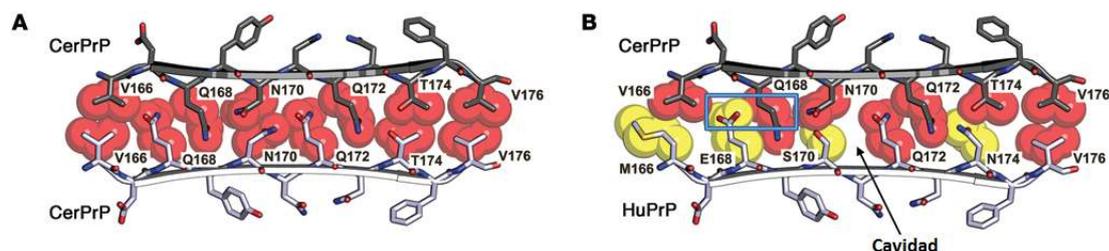


Figura 36. Modelo de la cremallera estérica. A) PrP de cérvido (en negro) interaccionado con PrP de cérvido (en blanco) según el modelo de la cremallera estérica. Se indican las posiciones de los residuos aminoacídicos más críticos en este modelo. A) PrP de cérvido (en negro) interaccionado con PrP de humano (en blanco) según el modelo de la cremallera estérica. Se indican las posiciones de los residuos aminoacídicos más críticos en este modelo, así como el choque estérico (cuadrado azul) ocasionado por las diferencias aminoacídicas de las posiciones 168 del lazo rígido de sendas PrP y la cavidad ocasionada por las diferencias aminoacídicas de las posiciones 170 del lazo rígido de ambas PrP. (Kurt 2015)

Además de las posiciones 168 y 170, que reducen esta barrera de transmisión entre cérvido y humano, Kurt y colaboradores introdujeron la sustitución N174Y en la PrP humana. Se observó que, a pesar de aumentar la homología con la PrP de cérvido, no favorecía la conversión, es decir, no reducía el efecto de la barrera de transmisión. Esto se debe al papel importante que juegan las N y las Q en esta barrera, ya que la presencia de segmentos proteicos ricos en dichos aminoácidos en el lazo rígido juegan un papel importante en la agregación de las PrP debido a la formación de puentes de hidrógenos entre los grupos amida que estabilizan las láminas β adyacentes. De este modo, aunque dicha sustitución aminoacídica aumentaba la homología entre las PrP de las dos especies estudiadas, eliminaba una asparagina, dificultando la conversión (408). Esto guarda relación con los sorprendentes resultados obtenidos en nuestro estudio, en los que la sustitución aminoacídica puntual S170N aumentó notablemente la propagación de la PrP^{Sc} de la ECJ en sustrato recombinante humano con respecto al genotipo silvestre al introducir una N nueva a pesar de aumentar las diferencias entre las secuencias aminoacídicas de la PrP del sustrato y la semilla.

DISCUSIÓN

No obstante, una limitación que presenta cualquier interpretación que trate de explicar el efecto de ciertas sustituciones aminoácidas en el malplegamiento proteico es la de desconocer la estructura de la PrP^{Sc}. Desgraciadamente sólo se puede discutir el potencial efecto que los cambios tienen sobre la estabilidad de la PrP^C así como impedimentos estéricos potenciales en la unión de esta proteína con la PrP^{Sc}. Se asume que algunos cambios probablemente tengan una mayor incidencia sobre la estructura de la PrP^{Sc} estabilizando o favoreciendo su malplegamiento mientras que otros pudieran generar impedimentos estéricos que hicieran más difícil su plegamiento.

Otro resultado sorprendente ha sido que la propagación de ECJ en PrP recombinante de cérvido ha revelado también una mayor importancia de los residuos del lazo β 2- α 2, sugiriendo que esta zona es crítica no sólo para la transmisibilidad de priones de cérvido a humanos, sino también para los priones humanos a cérvidos. Lo cual, remarca la importancia de esta zona en la barrera interespecie estudiada, puesto que la barrera de transmisión no acostumbra a ser bidireccional ya que no está condicionada únicamente por las diferencias en la secuencia aminoácida, si no que parece regirse más bien por propiedades conformacionales de la PrP^{res} y la PrP nativa, las cuales son afectadas por las diferencias aminoácidas puntuales de distinta forma en función del entorno (453). Por tanto, puede concluirse que la zona del lazo rígido es el principal determinante estructural para la transmisibilidad tanto de priones de cérvido a humano como de priones de humano a cérvido.

Además de las sustituciones en el lazo β 2- α 2, en este estudio destaca también la posición 155 de la PrP de humano. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en un estudio en el que lisados de células que contenían PrP^C humanas con diferentes sustituciones aminoácidas puntuales de cérvido en posiciones diferentes a las del lazo rígido se inocularon con semillas de priones de EDC de cérvidos, observándose un alto nivel de conversión de PrP^C en las posiciones 143 y 155. Esto sugiere que dichas posiciones también contribuyen a la transmisión de la EDC a humanos. El hecho de que en nuestro estudio se corrobore la relevancia del residuo 155 pero no del 143 puede deberse a las diferencias entre las PrP humanas con sustituciones aminoácidas puntuales y sus equivalentes recombinantes, así como las diferencias entre un modelo celular y uno *in vitro* para el estudio (408).

Por otro lado, la importancia del residuo 112 de la PrP humana en el fenómeno de la barrera interespecie sugerida por nuestros resultados coincide con los resultados de un estudio en el que se utilizaron anticuerpos monoclonales para bloquear posibles sitios de interacción de la PrP^C de ratón con la PrP^{Sc} y, por tanto, previniendo la conversión de la primera en la segunda. En dicho estudio se observó que la región comprendida por los aminoácidos 89 al 112 de la PrP constituye una zona de interacción

DISCUSIÓN

entre las dos isoformas de la proteína priónica (454), por tanto, al introducir una sustitución aminoacídica puntual de ciervo en la posición 112 de la PrP humana, hemos favorecido la interacción entre dicha PrP y el inóculo de EDC de cévido y, por consiguiente, la conversión de la primera en su isoforma infectiva.

Para concluir, cabe mencionar la importancia de las glicosilaciones y de la estructura tridimensional en la transmisibilidad de las prionopatías (455). El primero de estos dos factores no puede ser testeado en este estudio ya que, como se ha comentado previamente, las proteínas priónicas recombinantes carecen de dichas modificaciones postraduccionales. En cuanto a la posible compatibilidad estructural necesaria entre PrP^C y PrP^{Sc}, cualquier interpretación está limitada al plano teórico debido al desconocimiento de la estructura a nivel atómico de la PrP^{Sc} y de cómo interacciona ésta con la PrP^C.

A falta de validar los resultados obtenidos en la rec-PMSA en modelos animales y a pesar de que pueden no correlacionar perfectamente con lo observado *in vitro*, queda demostrada la utilidad de la PMSA como herramienta para evaluar el efecto de cambios aminoacídicos en la propagación de priones y su transmisibilidad interespecies. Esta tecnología ha permitido detectar sustituciones y regiones dentro de la PrP relevantes en la barrera de transmisión interespecies entre cévidos. Lo cual, podría facilitar futuros estudios de los mecanismos moleculares por los que dichas sustituciones pudieran ser críticas, al dirigirlos a las regiones de interés. No obstante, para dar mayor robustez a los resultados obtenidos, sería de gran interés ampliar el estudio incluyendo PrPs con múltiples sustituciones o con sustituciones alternativas a las realizadas para tratar de obtener más información acerca del posible efecto de las sustituciones a nivel de la estructura terciaria de la PrP o su interacción con la PrP^{Sc}.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los confórmeros obtenidos por el malplegamiento espontáneo *in vitro* de las rec-PrP basadas en las variantes polimórficas de las PrP de cérvidos presentan propiedades bioquímicas y biológicas que permiten clasificarlas como cepas priónicas bona fide, siendo por ello un modelo idóneo para el estudio de su emergencia y evolución.
2. La PMSA se ha adaptado para el malplegamiento espontáneo *in vitro* de las rec-PrP de corzo y uapití, ajustando los parámetros óptimos para la obtención sistematizada de rec-PrPres de cérvidos.
3. Los confórmeros de corzo y uapití obtenidos por malplegamiento espontáneo *in vitro* han mostrado diferentes propiedades bioquímicas, habiéndose analizado mediante un panel de pruebas *in vitro* que ha permitido su caracterización como cepas diferentes.
4. La presencia o ausencia de un cofactor polianiónico durante el malplegamiento espontáneo *in vitro* de las rec-PrP de corzo y uapití provoca la emergencia de nuevos confórmeros con propiedades bioquímicas distinguibles.
5. Los confórmeros obtenidos por malplegamiento espontáneo *in vitro* en presencia o ausencia de cofactor cambian sus propiedades bioquímicas tras propagar en un entorno sin o con cofactor, respectivamente, recuperando mayoritariamente sus propiedades originales al volver a ser adaptados al medio en el que fueron generados.
6. Los confórmeros de corzo y uapití obtenidos por malplegamiento espontáneo *in vitro* en presencia o ausencia de cofactor son priones recombinantes bona fide capaces de inducir una enfermedad priónica en ratones transgénicos que expresan la PrP^C del topillo rojo.
7. La obtención sistematizada de rec-PrPres de cérvidos por malplegamiento espontáneo mediante PMSA ha permitido evaluar el efecto de cada polimorfismo descrito en las PrP de cérvidos sobre dicho malplegamiento.
8. Se ha detectado una menor propensión al malplegamiento espontáneo *in vitro* asociada a la presencia de polimorfismos en regiones concretas de la rec-PrP, especialmente en los alrededores del giro $\beta 2-\alpha 2$.
9. Mediante la evaluación de las propiedades bioquímicas de las variantes polimórficas recombinantes de las rec-PrP de cérvidos malplegadas espontáneamente *in vitro*, se han clasificado 24 potenciales cepas diferentes, destacando $\alpha 0(-)$ como la cepa más frecuente.

CONCLUSIONES

10. Se ha descrito una evolución convergente hacia la cepa $\alpha 0(-)$ tras la adaptación de las semillas recombinantes obtenidas por el malplegamiento espontáneo in vitro de las variantes polimórficas de las PrP de cérvidos a la rec-PrP de corzo.

11. La generación de una rec-PrP de cérvido con una deleción en el extremo C-terminal ha permitido evaluar el papel de esta región sobre el malplegamiento in vitro, evidenciando su importancia en la evolución de las cepas priónicas.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

1. **Prusiner SB.** 1998. Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:13363-13383.
2. **Asher DM, Gregori L.** 2018. Human transmissible spongiform encephalopathies: historic view. *Handb Clin Neurol* **153**:1-17.
3. **Imran M, Mahmood S.** 2011. An overview of animal prion diseases. *Virology* **8**:493.
4. **Babelhadj B, Di Bari MA, Pirisinu L, Chiappini B, Gaouar SBS, Riccardi G, Marcon S, Agrimi U, Nonno R, Vaccari G.** 2018. Prion Disease in Dromedary Camels, Algeria. *Emerging Infectious Diseases* **24**:1029-1036.
5. **Colby DW, Prusiner SB.** 2011. De novo generation of prion strains. *Nat Rev Microbiol* **9**:771-777.
6. **Liberski PP, Sikorska B, Brown P.** 2012. Kuru: the first prion disease. *Adv Exp Med Biol* **724**:143-153.
7. **Liberski PP.** 2012. Historical overview of prion diseases: a view from afar. *Folia Neuropathol* **50**:1-12.
8. **Cuille J, Chelle P.** 1936. La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable? *CR Acad Sci* **203**:1552-1554.
9. **Gordon WS.** 1946. Advances in veterinary research. *Vet Rec* **58**:516-525.
10. **Wilson DR, Anderson RD, Smith W.** 1950. Studies in scrapie. *J Comp Pathol* **60**:267-282.
11. **Stamp JT, Brotherston JG, Zlotnik I, Mackay JM, Smith W.** 1959. Further studies on scrapie. *J Comp Pathol* **69**:268-280.
12. **Creutzfeldt H.** 1920. Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z Gesamte Neurol Psychiatr* **57**:1-19.
13. **Jakob A.** 1921. Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischem Befunde. (Spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Z Gesamte Neurol Psychiatr* **64**:147-228.
14. **Spielmeyer W.** 1922. Die Histopathologische Forschung in der Psychiatrie. *Klinische Wochenschrift* **1**:1817-1819.
15. **Lanska DJ.** 2017. Etymologia: Creutzfeldt-Jakob Disease. *Emerg Infect Dis* **23(10)**:1760-1761.
16. **Lanska DJ.** 2021. Clarence J. Gibbs Effect and the "Creutzfeldt-Jakob Disease" Eponym. *Neurology* doi:10.1212/wnl.0000000000012199 PMID - 33986133:10.1212/WNL.0000000000012199.
17. **Zeidman LA, Ziller MG, Shevell M.** 2014. Gerstmann, Straüssler, and Scheinker. The persecution of the men behind the syndrome. *Neurology* **83**:272-277.
18. **Boellaard JW, Schlote W.** 1980. [Subacute spongiform encephalopathy with multiform plaque formation. "Peculiar familial-hereditary disease of CNS [spinocerebellar atrophy with dementia, plaques, and plaque-like deposits in cerebellum and cerebrum" (Gerstmann, Straussler, Scheinker)] (author's transl)]. *Acta Neuropathol* **49**:205-212.
19. **Liberski PP, Gajos A, Sikorska B, Lindenbaum S.** 2019. Kuru, the First Human Prion Disease. *Viruses* **11**.
20. **Gajdusek C, Zigas V.** 1957. Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population *N Engl J Med* **257(20)**:974-978.
21. **Zigas V, Gajdusek C.** 1957. Kuru: clinical study of a new syndrome resembling paralysis agitans in natives of the Eastern Highlands of Australian New Guinea. *Med J Aust* **44(21)**:745-754.
22. **Klatzo I, Gajdusek DC, Zigas V.** 1959. Pathology of Kuru. *Lab Invest* **8**:799-847.
23. **Gajdusek C, Zigas V.** 1961. Studies on kuru. I. The ethnologic setting of kuru *Am J Trop Med Hyg* **10**:80-91.
24. **Marsh RF, Hadlow WJ.** 1992. Transmissible mink encephalopathy. *Rev Sci Tech* **11**:539-550.
25. **Hadlow WJ.** 1959. Scrapie and Kuru. *Lancet* **2**:289-290.
26. **Gajdusek C, Gibbs C, Alpers M.** 1966. Experimental transmission of kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* **209**:794-796.

REFERENCIAS

27. **Gajdusek C, Gibbs C, Asher D, David E.** 1968. Transmission of Experimental Kuru to the Spider Monkey (*Ateles geoffreyi*). *Science* **162(3854)**:693-694.
28. **Torrey EF, Peterson MR.** 1973. Slow and latent viruses in schizophrenia *Lancet* **2(7819)**.
29. **Gibbs CJ, Jr., Gajdusek DC, Asher DM, Alpers MP, Beck E, Daniel PM, Matthews WB.** 1968. Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science* **161**:388-389.
30. **Nevin S, McMenemey WH, Behrman S, Jones DP.** 1960. Subacute Spongiform Encephalopathy. A Subacute Form of Encephalopathy. *Brain* **83**.
31. **Duffy P, Wolf J, Collins G, DeVoe AG, Streeten B, Cowen D.** 1974. Letter: Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* **290**:692-693.
32. **Brown P, Brandel JP, Sato T, Nakamura Y, MacKenzie J, Will RG, Ladogana A, Pocchiari M, Leschek EW, Schonberger LB.** 2012. Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease, final assessment. *Emerg Infect Dis* **18**:901-907.
33. **Manuelidis EE, Gorgacz EJ, Manuelidis L.** 1978. Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease with scrapie-like syndromes to mice. *Nature* **271**:778-779.
34. **Kuroda Y, Gibbs CJJ, Amyx HL, Gajdusek DC.** 1983. Creutzfeldt-Jakob disease in mice: persistent viremia and preferential replication of virus in low-density lymphocytes. *Infect Immun* **41**:154-161.
35. **Hunter N, Houston F.** 2002. Can prion diseases be transmitted between individuals via blood transfusion: evidence from sheep experiments. *Dev Biol (Basel)* **108**:93-98.
36. **Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RS, Amar K, Cousens S, Mackenzie J, Will RG.** 2004. Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* **363**:417-421.
37. **Lugaresi E, Medori R, Montagna P, Baruzzi A, Cortelli P, Lugaresi A, Tinuper P, Zucconi M, Gambetti P.** 1986. Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N Engl J Med* **315**:997-1003.
38. **Medori R, Tritschler HJ, LeBlanc A, Villare F, Manetto V, Chen HY, Xue R, Leal S, Montagna P, Cortelli P, et al.** 1992. Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene. *N Engl J Med* **326**:444-449.
39. **Goldfarb LG, Brown P, Haltia M, Cathala F, McCombie WR, Kovanen J, Cervenakova L, Goldin L, Nieto A, Godec MS, et al.** 1992. Creutzfeldt-Jakob disease cosegregates with the codon 178Asn PRNP mutation in families of European origin. *Ann Neurol* **31**:274-281.
40. **Gambetti P, Dong Z, Yuan J, Xiao X, Zheng M, Alsheklee A, Castellani R, Cohen M, Barria MA, Gonzalez-Romero D, Belay ED, Schonberger LB, Marder K, Harris C, Burke JR, Montine T, Wisniewski T, Dickson DW, Soto C, Hulette CM, Mastrianni JA, Kong Q, Zou WQ.** 2008. A novel human disease with abnormal prion protein sensitive to protease. *Ann Neurol* **63**:697-708.
41. **Zou WQ, Puoti G, Xiao X, Yuan J, Qing L, Cali I, Shimoji M, Langeveld JP, Castellani R, Notari S, Crain B, Schmidt RE, Geschwind M, Dearmond SJ, Cairns NJ, Dickson D, Honig L, Torres JM, Mastrianni J, Capellari S, Giaccone G, Belay ED, Schonberger LB, Cohen M, Perry G, Kong Q, Parchi P, Tagliavini F, Gambetti P.** 2010. Variably protease-sensitive prionopathy: a new sporadic disease of the prion protein. *Ann Neurol* **68**:162-172.
42. **Pattison IH, Sansom BF.** 1964. Dialysis of the Scrapie Agent. *Research in Veterinary Science* **5**:340-347.
43. **Pattison IH, Millson GC.** 1961. Scrapie Produced Experimentally in Goats With Special Reference To the Clinical Syndrome. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics* **71**:101-IN110.
44. **Lampert PW, Gajdusek DC, Gibbs CJ, Jr.** 1972. Subacute spongiform virus encephalopathies. Scrapie, Kuru and Creutzfeldt-Jakob disease: a review. *Am J Pathol* **68**:626-652.
45. **Chandler RL.** 1961. Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet* **1**:1378-1379.

REFERENCIAS

46. **Zlotnik I, Rennie JC.** 1963. Further observations on the experimental transmission of scrapie from sheep and goats to laboratory mice. *J Comp Pathol* **73**:150-162.
47. **Chandler RL, Fisher J.** 1963. Experimental Transmission of Scrapie to Rats. *Lancet* **2**:1165.
48. **Pattison IH.** 1972. Scrapie--a personal view. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* **6**:110-114.
49. **Gibbs CJ, Jr.** 1967. Search for infectious etiology in chronic and subacute degenerative diseases of the central nervous system. *Curr Top Microbiol Immunol* **40**:44-58.
50. **Alper T, Haig DA, Clarke MC.** 1966. The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem Biophys Res Commun* **22**:278-284.
51. **Alper T, Cramp WA, Haig DA, Clarke MC.** 1967. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* **214**:764-766.
52. **Pattison IH, Jones KM.** 1967. The possible nature of the transmissible agent of scrapie. *Vet Rec* **80**:2-9.
53. **Gibbons RA, Hunter GD.** 1967. Nature of the scrapie agent. *Nature* **215**:1041-1043.
54. **Griffith JS.** 1967. Self-replication and scrapie. *Nature* **215**:1043-1044.
55. **Prusiner SB, Cochran SP, Baringer JR, Groth D, Masiarz F, McKinley M, Bildstein C, Garfin D, Hadlow WJ, Race RE, Eklund CM.** 1980. Slow viruses: molecular properties of the agents causing scrapie in mice and hamsters. *Prog Clin Biol Res* **39**:73-89.
56. **Prusiner SB, Groth DF, Cochran SP, Masiarz FR, McKinley MP, Martinez HM.** 1980. Molecular properties, partial purification, and assay by incubation period measurements of the hamster scrapie agent. *Biochemistry* **19**:4883-4891.
57. **Prusiner SB, Groth DF, McKinley MP, Cochran SP, Bowman KA, Kasper KC.** 1981. Thiocyanate and hydroxyl ions inactivate the scrapie agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**:4606-4610.
58. **Hunter GD, Millson GC.** 1967. Attempts to release the scrapie agent from tissue debris. *J Comp Pathol* **77**:301-307.
59. **Cho HJ.** 1980. Requirement of a protein component for scrapie infectivity. *Intervirology* **14**:213-216.
60. **Prusiner SB.** 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**:136-144.
61. **Prusiner SB, Bolton DC, Groth DF, Bowman KA, Cochran SP, McKinley MP.** 1982. Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry* **21**:6942-6950.
62. **Prusiner SB, McKinley MP, Bowman KA, Bolton DC, Bendheim PE, Groth DF, Glenner GG.** 1983. Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* **35**:349-358.
63. **Merz PA, Somerville RA, Wisniewski HM, Iqbal K.** 1981. Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta Neuropathol* **54**:63-74.
64. **Merz PA, Somerville RA, Wisniewski HM, Manuelidis L, Manuelidis EE.** 1983. Scrapie-associated fibrils in Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature* **306**:474-476.
65. **Prusiner SB, Groth DF, Bolton DC, Kent SB, Hood LE.** 1984. Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. *Cell* **38**:127-134.
66. **Chesebro B, Race R, Wehrly K, Nishio J, Bloom M, Lechner D, Bergstrom S, Robbins K, Mayer L, Keith JM, et al.** 1985. Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* **315**:331-333.
67. **Oesch B, Westaway D, Walchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE, et al.** 1985. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* **40**:735-746.
68. **Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Walchli M, Groth DF, McKinley MP, Prusiner SB, Weissmann C.** 1986. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* **46**:417-428.
69. **Carlson GA, Kingsbury DT, Goodman PA, Coleman S, Marshall ST, DeArmond S, Westaway D, Prusiner SB.** 1986. Linkage of prion protein and scrapie incubation time genes. *Cell* **46**:503-511.

REFERENCIAS

70. **Kimberlin RH.** 1982. Scrapie agent: prions or virinos? *Nature* **297**:107-108.
71. **Dickinson AG, Outram GW.** 1988. Genetic aspects of unconventional virus infections: the basis of the virino hypothesis. *Ciba Found Symp* **135**:63-83.
72. **Dickinson AG, Mackay JM.** 1964. Genetical Control of the Incubation Period in Mice of the Neurological Disease, Scrapie. *Heredity (Edinb)* **19**:279-288.
73. **Dickinson AG, Meikle VM, Fraser H.** 1968. Identification of a gene which controls the incubation period of some strains of scrapie agent in mice. *J Comp Pathol* **78**:293-299.
74. **Moore RC, Hope J, McBride PA, McConnell I, Selfridge J, Melton DW, Manson JC.** 1998. Mice with gene targeted prion protein alterations show that Prnp, Sinc and Prni are congruent. *Nat Genet* **18**:118-125.
75. **Hsiao K, Baker HF, Crow TJ, Poulter M, Owen F, Terwilliger JD, Westaway D, Ott J, Prusiner SB.** 1989. Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. *Nature* **338**:342-345.
76. **Goldfarb LG, Brown P, Mitrova E, Cervenakova L, Goldin L, Korczyn AD, Chapman J, Galvez S, Cartier L, Rubenstein R, et al.** 1991. Creutzfeldt-Jacob disease associated with the PRNP codon 200Lys mutation: an analysis of 45 families. *Eur J Epidemiol* **7**:477-486.
77. **Goldfarb LG, Petersen RB, Tabaton M, Brown P, LeBlanc AC, Montagna P, Cortelli P, Julien J, Vital C, Pendelbury WW, et al.** 1992. Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: disease phenotype determined by a DNA polymorphism. *Science* **258**:806-808.
78. **Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K, Prusiner SB.** 1987. Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* **51**:229-240.
79. **Stahl N, Baldwin MA, Teplow DB, Hood L, Gibson BW, Burlingame AL, Prusiner SB.** 1993. Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry* **32**:1991-2002.
80. **Caughey BW, Dong A, Bhat KS, Ernst D, Hayes SF, Caughey WS.** 1991. Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry* **30**:7672-7680.
81. **Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE, et al.** 1993. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:10962-10966.
82. **Meyer RK, McKinley MP, Bowman KA, Braunfeld MB, Barry RA, Prusiner SB.** 1986. Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:2310-2314.
83. **Cohen FE, Prusiner SB.** 1998. Pathologic conformations of prion proteins. *Annu Rev Biochem* **67**:793-819.
84. **Fraser H, Bruce M.** 1973. Argyrophilic plaques in mice inoculated with scrapie from particular sources. *Lancet* **1**:617-618.
85. **Fraser H, Bruce ME, Chree A, McConnell I, Wells GA.** 1992. Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice. *J Gen Virol* **73 (Pt 8)**:1891-1897.
86. **Kitamoto T, Tateishi J, Sawa H, Doh-Ura K.** 1989. Positive transmission of Creutzfeldt-Jakob disease verified by murine kuru plaques. *Lab Invest* **60**:507-512.
87. **Kimberlin RH, Walker C.** 1977. Characteristics of a short incubation model of scrapie in the golden hamster. *J Gen Virol* **34**:295-304.
88. **Kimberlin RH, Walker CA.** 1978. Evidence that the transmission of one source of scrapie agent to hamsters involves separation of agent strains from a mixture. *J Gen Virol* **39**:487-496.
89. **Kimberlin RH, Walker CA, Fraser H.** 1989. The genomic identity of different strains of mouse scrapie is expressed in hamsters and preserved on reisolation in mice. *J Gen Virol* **70 (Pt 8)**:2017-2025.

REFERENCIAS

90. **Palmiter RD, Chen HY, Brinster RL.** 1982. Differential regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion genes in transgenic mice and their offspring. *Cell* **29**:701-710.
91. **Scott M, Foster D, Miranda C, Serban D, Coufal F, Walchli M, Torchia M, Groth D, Carlson G, DeArmond SJ, Westaway D, Prusiner SB.** 1989. Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell* **59**:847-857.
92. **Hsiao KK, Scott M, Foster D, Groth DF, DeArmond SJ, Prusiner SB.** 1990. Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with mutant prion protein. *Science* **250**:1587-1590.
93. **Nazor KE, Kuhn F, Seward T, Green M, Zwald D, Purro M, Schmid J, Biffiger K, Power AM, Oesch B, Raeber AJ, Telling GC.** 2005. Immunodetection of disease-associated mutant PrP, which accelerates disease in GSS transgenic mice. *EMBO J* **24**:2472-2480.
94. **Torres JM, Castilla J, Pintado B, Gutierrez-Adan A, Andreoletti O, Aguilar-Calvo P, Arroba AI, Parra-Arrendo B, Ferrer I, Manzanares J, Espinosa JC.** 2013. Spontaneous generation of infectious prion disease in transgenic mice. *Emerg Infect Dis* **19**:1938-1947.
95. **Jackson WS, Borkowski AW, Watson NE, King OD, Faas H, Jasanoff A, Lindquist S.** 2013. Profoundly different prion diseases in knock-in mice carrying single PrP codon substitutions associated with human diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:14759-14764.
96. **Watts JC, Giles K, Stohr J, Oehler A, Bhardwaj S, Grillo SK, Patel S, DeArmond SJ, Prusiner SB.** 2012. Spontaneous generation of rapidly transmissible prions in transgenic mice expressing wild-type bank vole prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**:3498-3503.
97. **Bueler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, Weissmann C.** 1993. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* **73**:1339-1347.
98. **Bueler H, Raeber A, Sailer A, Fischer M, Aguzzi A, Weissmann C.** 1994. High prion and PrP^{Sc} levels but delayed onset of disease in scrapie-inoculated mice heterozygous for a disrupted PrP gene. *Mol Med* **1**:19-30.
99. **Carlson GA, Ebeling C, Yang SL, Telling G, Torchia M, Groth D, Westaway D, DeArmond SJ, Prusiner SB.** 1994. Prion isolate specified allotypic interactions between the cellular and scrapie prion proteins in congenic and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:5690-5694.
100. **Fischer M, Rulicke T, Raeber A, Sailer A, Moser M, Oesch B, Brandner S, Aguzzi A, Weissmann C.** 1996. Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J* **15**:1255-1264.
101. **Westaway D, DeArmond SJ, Cayetano-Canlas J, Groth D, Foster D, Yang SL, Torchia M, Carlson GA, Prusiner SB.** 1994. Degeneration of skeletal muscle, peripheral nerves, and the central nervous system in transgenic mice overexpressing wild-type prion proteins. *Cell* **76**:117-129.
102. **Saborio GP, Permanne B, Soto C.** 2001. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* **411**:810-813.
103. **Castilla J, Saa P, Hetz C, Soto C.** 2005. In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell* **121**:195-206.
104. **Legname G, Baskakov IV, Nguyen HO, Riesner D, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB.** 2004. Synthetic mammalian prions. *Science* **305**:673-676.
105. **Makarava N, Kovacs GG, Bocharova O, Savtchenko R, Alexeeva I, Budka H, Rohwer RG, Baskakov IV.** 2010. Recombinant prion protein induces a new transmissible prion disease in wild-type animals. *Acta Neuropathol* **119**:177-187.
106. **Wang F, Wang X, Yuan CG, Ma J.** 2010. Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein. *Science* **327**:1132-1135.
107. **Soto C.** 2011. Prion hypothesis: the end of the controversy? *Trends Biochem Sci* **36**:151-158.
108. **Wickner RB, Shewmaker FP, Bateman DA, Edskes HK, Gorkovskiy A, Dayani Y, Bezsonov EE.** 2015. Yeast prions: structure, biology, and prion-handling systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **79**:1-17.

REFERENCIAS

109. **Sabate R, Espargaro A, Saupe SJ, Ventura S.** 2009. Characterization of the amyloid bacterial inclusion bodies of the HET-s fungal prion. *Microb Cell Fact* **8**:56.
110. **Si K, Lindquist S, Kandel ER.** 2003. A neuronal isoform of the aplysia CPEB has prion-like properties. *Cell* **115**:879-891.
111. **Hou F, Sun L, Zheng H, Skaug B, Jiang QX, Chen ZJ.** 2011. MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell* **146**:448-461.
112. **Bessen RA, Kocisko DA, Raymond GJ, Nandan S, Lansbury PT, Caughey B.** 1995. Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein. *Nature* **375**:698-700.
113. **Magnusson K, Simon R, Sjölander D, Sigurdson C, Hammarström P, Nilsson K.** 2014. Multimodal fluorescence microscopy of prion strain specific PrP deposits stained by thiophene-based amyloid ligands. *Prion* **8**:319-329.
114. **Noble GP, Wang DW, Walsh DJ, Barone JR, Miller MB, Nishina KA, Li S, Supattapone S.** 2015. A Structural and Functional Comparison Between Infectious and Non-Infectious Autocatalytic Recombinant PrP Conformers. *PLoS Pathog* **11**:e1005017.
115. **Kraus A, Hoyt F, Schwartz CL, Hansen B, Artikis E, Hughson AG, Raymond GJ, Race B, Baron GS, Caughey B.** 2021. High-resolution structure and strain comparison of infectious mammalian prions. *Molecular Cell* doi:10.1016/j.molcel.2021.08.011 PMID - 34433091.
116. **Pattison J.** 1998. The emergence of bovine spongiform encephalopathy and related diseases. *Emerg Infect Dis* **4**:390-394.
117. **Bradley R, Collee JG, Liberski PP.** 2006. Variant CJD (vCJD) and bovine spongiform encephalopathy (BSE): 10 and 20 years on: part 1. *Folia Neuropathol* **44**:93-101.
118. **Collinge J.** 2001. Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci* **24**:519-550.
119. **Takada LT, Kim MO, Metcalf S, Gala, II, Geschwind MD.** 2018. Prion disease. *Handb Clin Neurol* **148**:441-464.
120. **Palmer MS, Dryden AJ, Hughes JT, Collinge J.** 1991. Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature* **352**:340-342.
121. **Windl O, Dempster M, Estibeiro JP, Lathe R, de Silva R, Esmonde T, Will R, Springbett A, Campbell TA, Sidle KC, Palmer MS, Collinge J.** 1996. Genetic basis of Creutzfeldt-Jakob disease in the United Kingdom: a systematic analysis of predisposing mutations and allelic variation in the PRNP gene. *Hum Genet* **98**:259-264.
122. **Mok T, Jaunmuktane Z, Joiner S, Campbell T, Morgan C, Wakerley B, Golestani F, Rudge P, Mead S, Jäger HR, Wadsworth JD, Brandner S, Collinge J.** 2017. Variant Creutzfeldt-Jakob Disease in a Patient with Heterozygosity at PRNP Codon 129. *New England Journal of Medicine* **376**:292-294.
123. **Aguzzi A, Calella AM.** 2009. Prions: protein aggregation and infectious diseases. *Physiol Rev* **89**:1105-1152.
124. **Minikel EV, Vallabh SM, Lek M, Estrada K, Samocha KE, Sathirapongsasuti JF, McLean CY, Tung JY, Yu LP, Gambetti P, Blevins J, Zhang S, Cohen Y, Chen W, Yamada M, Hamaguchi T, Sanjo N, Mizusawa H, Nakamura Y, Kitamoto T, Collins SJ, Boyd A, Will RG, Knight R, Ponto C, Zerr I, Kraus TF, Eigenbrod S, Giese A, Calero M, de Pedro-Cuesta J, Haik S, Laplanche JL, Bouaziz-Amar E, Brandel JP, Capellari S, Parchi P, Pologgi A, Ladogana A, O'Donnell-Luria AH, Karczewski KJ, Marshall JL, Boehnke M, Laakso M, Mohlke KL, Kähler A, Chambert K, McCarroll S, Sullivan PF, Hultman CM, et al.** 2016. Quantifying prion disease penetrance using large population control cohorts. *Sci Transl Med* **8**.
125. **Cracco L, Appleby BS, Gambetti P.** 2018. Fatal familial insomnia and sporadic fatal insomnia. *Handb Clin Neurol* **153**:271-299.
126. **Ironside JW, Ritchie DL, Head MW.** 2017. Prion diseases. *Handb Clin Neurol* **145**:393-403.

REFERENCIAS

127. **Hill AF, Joiner S, Wadsworth JD, Sidle KC, Bell JE, Budka H, Ironside JW, Collinge J.** 2003. Molecular classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain* **126**:1333-1346.
128. **Parchi P, de Boni L, Saverioni D, Cohen ML, Ferrer I, Gambetti P, Gelpi E, Giaccone G, Hauw JJ, Hofberger R, Ironside JW, Jansen C, Kovacs GG, Rozemuller A, Seilhean D, Tagliavini F, Giese A, Kretzschmar HA.** 2012. Consensus classification of human prion disease histotypes allows reliable identification of molecular subtypes: an inter-rater study among surveillance centres in Europe and USA. *Acta Neuropathol* **124**:517-529.
129. **Vallabh SM, Minikel EV, Schreiber SL, Lander ES.** 2020. Towards a treatment for genetic prion disease: trials and biomarkers. *The Lancet Neurology* **19**:361-368.
130. **Teruya K, Doh-Ura K.** 2017. Insights from Therapeutic Studies for PrP Prion Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **7**.
131. **Priola SA, Raines A, Caughey WS.** 2000. Porphyrin and phthalocyanine antiscrapie compounds. *Science* **287**:1503-1506.
132. **Raymond GJ, Zhao HT, Race B, Raymond LD, Williams K, Swayze EE, Graffam S, Le J, Caron T, Stathopoulos J, O'Keefe R, Lubke LL, Reidenbach AG, Kraus A, Schreiber SL, Mazur C, Cabin DE, Carroll JB, Minikel EV, Kordasiewicz H, Caughey B, Vallabh SM.** 2019. Antisense oligonucleotides extend survival of prion-infected mice. *JCI Insight* **5**.
133. **Dyer C.** 2018. British man with CJD gets experimental treatment in world first. *BMJ* **363**:k4608.
134. **Killworth H.** 2018. Pioneering treatment to be given to CJD patient for the first time. <https://www.ucl.ac.uk/news/2019/oct/sixth-patient-receives-pioneering-treatment-cjd>. Accessed
135. **Forloni G, Tettamanti M, Lucca U, Albanese Y, Quaglio E, Chiesa R, Erbetta A, Villani F, Redaelli V, Tagliavini F, Artuso V, Roiter I.** 2015. Preventive study in subjects at risk of fatal familial insomnia: Innovative approach to rare diseases. *Prion* **9**:75-79.
136. **Forloni G, Salmona M, Marcon G, Tagliavini F.** 2009. Tetracyclines and prion infectivity. *Infect Disord Drug Targets* **9**:23-30.
137. **Hermann P, Zerr I.** 2022. Rapidly progressive dementias - aetiologies, diagnosis and management. *Nat Rev Neurol* **18**:363-376.
138. **Alvarez FJ, Bisbe J, Bisbe V, Davalos A.** 2005. Magnetic resonance imaging findings in pre-clinical Creutzfeldt-Jakob disease. *Int J Neurosci* **115**:1219-1225.
139. **Satoh K, Nakaoke R, Nishiura Y, Tsujino A, Motomura M, Yoshimura T, Sasaki K, Shigematsu K, Shirabe S, Eguchi K.** 2011. Early detection of sporadic CJD by diffusion-weighted MRI before the onset of symptoms. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **82**:942-943.
140. **Altuna M, Ruiz I, Zelaya MV, Mendioroz M.** 2022. Role of Biomarkers for the Diagnosis of Prion Diseases: A Narrative Review. *Medicina (Kaunas)* **58**.
141. **McGuire LI, Peden AH, Orru CD, Wilham JM, Appleford NE, Mallinson G, Andrews M, Head MW, Caughey B, Will RG, Knight RS, Green AJ.** 2012. Real time quaking-induced conversion analysis of cerebrospinal fluid in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* **72**:278-285.
142. **Rhoads DD, Wrona A, Foutz A, Blevins J, Glisic K, Person M, Maddox RA, Belay ED, Schonberger LB, Tatsuoka C, Cohen ML, Appleby BS.** 2020. Diagnosis of prion diseases by RT-QuIC results in improved surveillance. *Neurology* **95**:e1017-e1026.
143. **Erana H.** 2019. The Prion 2018 round tables (II): Abeta, tau, alpha-synuclein... are they prions, prion-like proteins, or what? *Prion* **13**:41-45.
144. **Prusiner SB.** 2013. Biology and genetics of prions causing neurodegeneration. *Annu Rev Genet* **47**:601-623.
145. **Erana H, Venegas V, Moreno J, Castilla J.** 2017. Prion-like disorders and Transmissible Spongiform Encephalopathies: An overview of the mechanistic features that are shared by the various disease-related misfolded proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **483**:1125-1136.

REFERENCIAS

146. **Harbi D, Harrison PM.** 2014. -Classifying prion and prion-like phenomena. *Prion* **8**:161-165.
147. **Scheckel C, Aguzzi A.** 2018. Prions, prionoids and protein misfolding disorders. *Nat Rev Genet* doi:10.1038/s41576-018-0011-4.
148. **Wopfner F, Weidenhofer G, Schneider R, von Brunn A, Gilch S, Schwarz TF, Werner T, Schatzl HM.** 1999. Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *J Mol Biol* **289**:1163-1178.
149. **Calzolari L, Lysek DA, Perez DR, Guntert P, Wuthrich K.** 2005. Prion protein NMR structures of chickens, turtles, and frogs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:651-655.
150. **Lee IY, Westaway D, Smit AF, Wang K, Seto J, Chen L, Acharya C, Ankener M, Baskin D, Cooper C, Yao H, Prusiner SB, Hood LE.** 1998. Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species. *Genome Res* **8**:1022-1037.
151. **Goldmann W.** 1993. PrP gene and its association with spongiform encephalopathies. *Br Med Bull* **49**:839-859.
152. **Prusiner SB, Scott MR.** 1997. Genetics of prions. *Annu Rev Genet* **31**:139-175.
153. **Gill AC, Castle AR.** 2018. The cellular and pathologic prion protein. *Handb Clin Neurol* **153**:21-44.
154. **Mobley WC, Neve RL, Prusiner SB, McKinley MP.** 1988. Nerve growth factor increases mRNA levels for the prion protein and the beta-amyloid protein precursor in developing hamster brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:9811-9815.
155. **Moser M, Colello RJ, Pott U, Oesch B.** 1995. Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. *Neuron* **14**:509-517.
156. **Thellung S, Corsaro A, Bosio AG, Zambito M, Barbieri F, Mazzanti M, Florio T.** 2019. Emerging Role of Cellular Prion Protein in the Maintenance and Expansion of Glioma Stem Cells. *Cells* **8**.
157. **Goldmann W, Hunter N, Smith G, Foster J, Hope J.** 1994. PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie. *J Gen Virol* **75 (Pt 5)**:989-995.
158. **Kim MO, Takada LT, Wong K, Forner SA, Geschwind MD.** 2018. Genetic PrP Prion Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **10**.
159. **Heller U, Winklhofer KF, Heske J, Reintjes A, Tatzelt J.** 2003. Post-translational import of the prion protein into the endoplasmic reticulum interferes with cell viability: a critical role for the putative transmembrane domain. *J Biol Chem* **278**:36139-36147.
160. **Caughey B, Race RE, Ernst D, Buchmeier MJ, Chesebro B.** 1989. Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. *J Virol* **63**:175-181.
161. **Puig B, Altmeyden H, Glatzel M.** 2014. The GPI-anchoring of PrP. *Prion* **8**:11-18.
162. **Stahl N, Baldwin MA, Hecker R, Pan KM, Burlingame AL, Prusiner SB.** 1992. Glycosylinositol phospholipid anchors of the scrapie and cellular prion proteins contain sialic acid. *Biochemistry* **31**:5043-5053.
163. **DeArmond SJ, Qiu Y, Sanchez H, Spilman PR, Ninchak-Casey A, Alonso D, Daggett V.** 1999. PrP^C glycoform heterogeneity as a function of brain region: implications for selective targeting of neurons by prion strains. *J Neuropathol Exp Neurol* **58**:1000-1009.
164. **Taylor DR, Watt NT, Perera WS, Hooper NM.** 2005. Assigning functions to distinct regions of the N-terminus of the prion protein that are involved in its copper-stimulated, clathrin-dependent endocytosis. *J Cell Sci* **118**:5141-5153.
165. **Shyng SL, Huber MT, Harris DA.** 1993. A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. *J Biol Chem* **268**:15922-15928.
166. **Riek R, Hornemann S, Wider G, Billeter M, Glockshuber R, Wuthrich K.** 1996. NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231). *Nature* **382**:180-182.
167. **Taubner LM, Bienkiewicz EA, Copie V, Caughey B.** 2010. Structure of the flexible amino-terminal domain of prion protein bound to a sulfated glycan. *J Mol Biol* **395**:475-490.

REFERENCIAS

168. **Haigh CL, Tumpach C, Drew SC, Collins SJ.** 2015. The Prion Protein N1 and N2 Cleavage Fragments Bind to Phosphatidylserine and Phosphatidic Acid; Relevance to Stress-Protection Responses. *PLoS One* **10**:e0134680.
169. **Martin R, Gallet PF, Rocha D, Petit D.** 2009. Polymorphism of the prion protein in mammals: a phylogenetic approach. *Recent Pat DNA Gene Seq* **3**:63-71.
170. **Mitteregger G, Vosko M, Krebs B, Xiang W, Kohlmansperger V, Nolting S, Hamann GF, Kretzschmar HA.** 2007. The role of the octarepeat region in neuroprotective function of the cellular prion protein. *Brain Pathol* **17**:174-183.
171. **Stockel J, Safar J, Wallace AC, Cohen FE, Prusiner SB.** 1998. Prion protein selectively binds copper(II) ions. *Biochemistry* **37**:7185-7193.
172. **Perera WS, Hooper NM.** 2001. Ablation of the metal ion-induced endocytosis of the prion protein by disease-associated mutation of the octarepeat region. *Curr Biol* **11**:519-523.
173. **Zahn R.** 2003. The octapeptide repeats in mammalian prion protein constitute a pH-dependent folding and aggregation site. *J Mol Biol* **334**:477-488.
174. **Lysek DA, Schorn C, Nivon LG, Esteve-Moya V, Christen B, Calzolari L, von Schroetter C, Fiorito F, Herrmann T, Guntert P, Wuthrich K.** 2005. Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs, and sheep. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:640-645.
175. **Erana H, Fernandez-Borges N, Elezgarai SR, Harrathi C, Charco JM, Chianini F, Dagleish MP, Ortega G, Millet O, Castilla J.** 2017. In Vitro Approach To Identify Key Amino Acids in Low Susceptibility of Rabbit Prion Protein to Misfolding. *J Virol* **91**.
176. **Lloyd S, Mead S, Collinge J.** 2011. Genetics of prion disease. *Top Curr Chem* **305**:1-22.
177. **Nosjean O, Briolay A, Roux B.** 1997. Mammalian GPI proteins: sorting, membrane residence and functions. *Biochim Biophys Acta* **1331(2)**:153-186.
178. **Liu T, Li R, Pan T, Liu D, Petersen RB, Wong BS, Gambetti P, Sy MS.** 2002. Intercellular transfer of the cellular prion protein. *J Biol Chem* **277**:47671-47678.
179. **Speare JO, Offerdahl DK, Hasenkrug A, Carmody AB, Baron GS.** 2010. GPI anchoring facilitates propagation and spread of misfolded Sup35 aggregates in mammalian cells. *EMBO J* **29**:782-794.
180. **Chesebro B, Race B, Meade-White K, Lacasse R, Race R, Klingeborn M, Striebel J, Dorward D, McGovern G, Jeffrey M.** 2010. Fatal transmissible amyloid encephalopathy: a new type of prion disease associated with lack of prion protein membrane anchoring. *PLoS Pathog* **6**:e1000800.
181. **Wadsworth JD, Hill AF, Beck JA, Collinge J.** 2003. Molecular and clinical classification of human prion disease. *Br Med Bull* **66**:241-254.
182. **Lewis PA, Properzi F, Prodromidou K, Clarke AR, Collinge J, Jackson GS.** 2006. Removal of the glycosylphosphatidylinositol anchor from PrP(Sc) by cathepsin D does not reduce prion infectivity. *Biochem J* **395**:443-448.
183. **Bueler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M, Weissmann C.** 1992. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* **356**:577-582.
184. **Richt JA, Kasinathan P, Hamir AN, Castilla J, Sathiyaseelan T, Vargas F, Sathiyaseelan J, Wu H, Matsushita H, Koster J, Kato S, Ishida I, Soto C, Robl JM, Kuroiwa Y.** 2007. Production of cattle lacking prion protein. *Nat Biotechnol* **25**:132-138.
185. **Yu G, Chen J, Yu H, Liu S, Xu X, Sha H, Zhang X, Wu G, Xu S, Cheng G.** 2006. Functional disruption of the prion protein gene in cloned goats. *J Gen Virol* **87**:1019-1027.
186. **Wulf MA, Senatore A, Aguzzi A.** 2017. The biological function of the cellular prion protein: an update. *BMC Biol* **15**:34.
187. **Weissmann C, Flechsig E.** 2003. PrP knock-out and PrP transgenic mice in prion research. *Br Med Bull* **66**:43-60.

REFERENCIAS

188. **Lugaresi E, Tobler I, Gambetti P, Montagna P.** 1998. The pathophysiology of fatal familial insomnia. *Brain Pathol* **8**:521-526.
189. **Tobler I, Gaus SE, Deboer T, Achermann P, Fischer M, Rulicke T, Moser M, Oesch B, McBride PA, Manson JC.** 1996. Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* **380**:639-642.
190. **Collinge J, Whittington MA, Sidle KC, Smith CJ, Palmer MS, Clarke AR, Jefferys JG.** 1994. Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* **370**:295-297.
191. **Wong BS, Liu T, Li R, Pan T, Petersen RB, Smith MA, Gambetti P, Perry G, Manson JC, Brown DR, Sy MS.** 2001. Increased levels of oxidative stress markers detected in the brains of mice devoid of prion protein. *J Neurochem* **76**:565-572.
192. **Steele AD, Lindquist S, Aguzzi A.** 2007. The prion protein knockout mouse: a phenotype under challenge. *Prion* **1**:83-93.
193. **Brandner S, Isenmann S, Raeber A, Fischer M, Sailer A, Kobayashi Y, Marino S, Weissmann C, Aguzzi A.** 1996. Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* **379**:339-343.
194. **Biasini E, Turnbaugh JA, Unterberger U, Harris DA.** 2012. Prion protein at the crossroads of physiology and disease. *Trends Neurosci* **35**:92-103.
195. **Malaga-Trillo E, Solis GP, Schrock Y, Geiss C, Luncz L, Thomanetz V, Stuermer CA.** 2009. Regulation of embryonic cell adhesion by the prion protein. *PLoS Biol* **7**:e55.
196. **Bremer J, Baumann F, Tiberi C, Wessig C, Fischer H, Schwarz P, Steele AD, Toyka KV, Nave KA, Weis J, Aguzzi A.** 2010. Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance. *Nat Neurosci* **13**:310-318.
197. **Nicolas O, Gavin R, del Rio JA.** 2009. New insights into cellular prion protein (PrP^c) functions: the "ying and yang" of a relevant protein. *Brain Res Rev* **61**:170-184.
198. **Safar J, Roller PP, Gajdusek DC, Gibbs CJ, Jr.** 1993. Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein. *J Biol Chem* **268**:20276-20284.
199. **Baskakov IV, Caughey B, Requena JR, Sevillano AM, Surewicz WK, Wille H.** 2019. The prion 2018 round tables (I): the structure of PrP(Sc). *Prion* **13**:46-52.
200. **van der Wel PCA.** 2017. Insights into protein misfolding and aggregation enabled by solid-state NMR spectroscopy. *Solid State Nucl Magn Reson* **88**:1-14.
201. **Kelly JW.** 1998. The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways *Curr Opin Struct Biol* **8**(1):101-106.
202. **Espargaro A, Busquets MA, Estelrich J, Sabate R.** 2015. Amyloids in solid-state nuclear magnetic resonance: potential causes of the usually low resolution. *Int J Nanomedicine* **10**:6975-6983.
203. **Tycko R.** 2006. Molecular structure of amyloid fibrils: insights from solid-state NMR. *Q Rev Biophys* **39**:1-55.
204. **Zahn R, von Schroetter C, Wuthrich K.** 1997. Human prion proteins expressed in *Escherichia coli* and purified by high-affinity column refolding. *FEBS Lett* **417**:400-404.
205. **Charco JM, Erana H, Venegas V, Garcia-Martinez S, Lopez-Moreno R, Gonzalez-Miranda E, Perez-Castro MA, Castilla J.** 2017. Recombinant PrP and Its Contribution to Research on Transmissible Spongiform Encephalopathies. *Pathogens* **6**.
206. **Wang F, Wang X, Orru CD, Groveman BR, Surewicz K, Abskharon R, Imamura M, Yokoyama T, Kim YS, Vander Stel KJ, Sinniah K, Priola SA, Surewicz WK, Caughey B, Ma J.** 2017. Self-propagating, protease-resistant, recombinant prion protein conformers with or without in vivo pathogenicity. *PLoS Pathog* **13**:e1006491.
207. **Makarava N, Baskakov IV.** 2008. The same primary structure of the prion protein yields two distinct self-propagating states. *J Biol Chem* **283**:15988-15996.

REFERENCIAS

208. **Deleault NR, Harris BT, Rees JR, Supattapone S.** 2007. Formation of native prions from minimal components in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:9741-9746.
209. **Diaz-Espinoza R, Soto C.** 2012. High-resolution structure of infectious prion protein: the final frontier. *Nat Struct Mol Biol* **19**:370-377.
210. **Gabizon R, McKinley MP, Prusiner SB.** 1987. Purified prion proteins and scrapie infectivity copartition into liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:4017-4021.
211. **Cronier S, Gros N, Tattum MH, Jackson GS, Clarke AR, Collinge J, Wadsworth JD.** 2008. Detection and characterization of proteinase K-sensitive disease-related prion protein with thermolysin. *Biochem J* **416**:297-305.
212. **Supattapone S, Bosque P, Muramoto T, Wille H, Aagaard C, Peretz D, Nguyen HO, Heinrich C, Torchia M, Safar J, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB, Scott M.** 1999. Prion protein of 106 residues creates an artificial transmission barrier for prion replication in transgenic mice. *Cell* **96**:869-878.
213. **Bessen RA, Marsh RF.** 1992. Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent. *J Virol* **66**:2096-2101.
214. **Sevillano AM, Fernandez-Borges N, Younas N, Wang F, S RE, Bravo S, Vazquez-Fernandez E, Rosa I, Erana H, Gil D, Veiga S, Vidal E, Erickson-Beltran ML, Guitian E, Silva CJ, Nonno R, Ma J, Castilla J, J RR.** 2018. Recombinant PrP^{Sc} shares structural features with brain-derived PrP^{Sc}: Insights from limited proteolysis. *PLoS Pathog* **14**:e1006797.
215. **Peretz D, Williamson RA, Matsunaga Y, Serban H, Pinilla C, Bastidas RB, Rozenshteyn R, James TL, Houghten RA, Cohen FE, Prusiner SB, Burton DR.** 1997. A conformational transition at the N terminus of the prion protein features in formation of the scrapie isoform. *J Mol Biol* **273**:614-622.
216. **Williamson RA, Peretz D, Pinilla C, Ball H, Bastidas RB, Rozenshteyn R, Houghten RA, Prusiner SB, Burton DR.** 1998. Mapping the prion protein using recombinant antibodies. *J Virol* **72**:9413-9418.
217. **Sim VL, Caughey B.** 2009. Ultrastructures and strain comparison of under-glycosylated scrapie prion fibrils. *Neurobiol Aging* **30**:2031-2042.
218. **Vazquez-Fernandez E, Vos MR, Afanasyev P, Cebey L, Sevillano AM, Vidal E, Rosa I, Renault L, Ramos A, Peters PJ, Fernandez JJ, van Heel M, Young HS, Requena JR, Wille H.** 2016. The Structural Architecture of an Infectious Mammalian Prion Using Electron Cryomicroscopy. *PLoS Pathog* **12**:e1005835.
219. **Eanes E, Glenner G.** 1968. X-ray diffraction studies on amyloid filaments. *J Histochem Cytochem* **16**:673-677.
220. **Zweckstetter M, Requena JR, Wille H.** 2017. Elucidating the structure of an infectious protein. *PLoS Pathog* **13**:e1006229.
221. **Skora L, Fonseca-Ornelas L, Hofele RV, Riedel D, Giller K, Watzlawik J, Schulz-Schaeffer WJ, Urlaub H, Becker S, Zweckstetter M.** 2013. Burial of the polymorphic residue 129 in amyloid fibrils of prion stop mutants. *J Biol Chem* **288**:2994-3002.
222. **Muller H, Brener O, Andreoletti O, Piechatek T, Willbold D, Legname G, Heise H.** 2014. Progress towards structural understanding of infectious sheep PrP-amyloid. *Prion* **8**:344-358.
223. **Aucoin D, Xia Y, Theint T, Nadaud PS, Surewicz K, Surewicz WK, Jaroniec CP.** 2018. Protein-solvent interfaces in human Y145Stop prion protein amyloid fibrils probed by paramagnetic solid-state NMR spectroscopy. *J Struct Biol* doi:10.1016/j.jsb.2018.04.002.
224. **Smirnovas V, Baron GS, Offerdahl DK, Raymond GJ, Caughey B, Surewicz WK.** 2011. Structural organization of brain-derived mammalian prions examined by hydrogen-deuterium exchange. *Nat Struct Mol Biol* **18**:504-506.

REFERENCIAS

225. **Downing DT, Lazo ND.** 1999. Molecular modelling indicates that the pathological conformations of prion proteins might be beta-helical. *Biochem J* **343 Pt 2**:453-460.
226. **Wille H, Bian W, McDonald M, Kendall A, Colby DW, Bloch L, Ollesch J, Borovinskiy AL, Cohen FE, Prusiner SB, Stubbs G.** 2009. Natural and synthetic prion structure from X-ray fiber diffraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:16990-16995.
227. **DeMarco ML, Daggett V.** 2004. From conversion to aggregation: protofibril formation of the prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:2293-2298.
228. **Cobb NJ, Sonnichsen FD, McHaourab H, Surewicz WK.** 2007. Molecular architecture of human prion protein amyloid: a parallel, in-register beta-structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:18946-18951.
229. **Groveman BR, Dolan MA, Taubner LM, Kraus A, Wickner RB, Caughey B.** 2014. Parallel in-register intermolecular beta-sheet architectures for prion-seeded prion protein (PrP) amyloids. *J Biol Chem* **289**:24129-24142.
230. **Tycko R, Savtchenko R, Ostapchenko VG, Makarava N, Baskakov IV.** 2010. The alpha-helical C-terminal domain of full-length recombinant PrP converts to an in-register parallel beta-sheet structure in PrP fibrils: evidence from solid state nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* **49**:9488-9497.
231. **Chesebro B, Trifilo M, Race R, Meade-White K, Teng C, LaCasse R, Raymond L, Favara C, Baron G, Priola S, Caughey B, Masliah E, Oldstone M.** 2005. Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science* **308**:1435-1439.
232. **Theint T, Nadaud PS, Aucoin D, Helmus JJ, Pondaven SP, Surewicz K, Surewicz WK, Jaroniec CP.** 2017. Species-dependent structural polymorphism of Y145Stop prion protein amyloid revealed by solid-state NMR spectroscopy. *Nat Commun* **8**:753.
233. **Baskakov IV, Katorcha E.** 2016. Multifaceted Role of Sialylation in Prion Diseases. *Front Neurosci* **10**:358.
234. **Wan W, Wille H, Stohr J, Baxa U, Prusiner SB, Stubbs G.** 2012. Degradation of fungal prion HET-s(218-289) induces formation of a generic amyloid fold. *Biophys J* **102**:2339-2344.
235. **Kraus A, Hoyt F, Schwartz CL, Hansen B, Hughson AG, Artikis E, Race B, Caughey B.** 2021. Structure of an infectious mammalian prion. *bioRxiv* (pre-print server) doi:<https://doi.org/10.1101/2021.02.14.431014>
236. **Wille H, Requena JR.** 2018. The Structure of PrP(Sc) Prions. *Pathogens* **7**.
237. **Wasmer C, Lange A, Van Melckebeke H, Siemer AB, Riek R, Meier BH.** 2008. Amyloid fibrils of the HET-s(218-289) prion form a beta solenoid with a triangular hydrophobic core. *Science* **319**:1523-1526.
238. **Requena JR, Wille H.** 2014. The structure of the infectious prion protein. *Prion* **8**:60-66.
239. **Spagnoli G, Rigoli M, Orioli S, Sevillano AM, Faccioli P, Wille H, Biasini E, Requena JR.** 2019. Full atomistic model of prion structure and conversion. *PLoS Pathog* **15**:e1007864.
240. **Halliday M, Radford H, Mallucci GR.** 2014. Prions: generation and spread versus neurotoxicity. *J Biol Chem* **289**:19862-19868.
241. **Mallucci G, Dickinson A, Linehan J, Klohn PC, Brandner S, Collinge J.** 2003. Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science* **302**:871-874.
242. **Mallucci GR, White MD, Farmer M, Dickinson A, Khatun H, Powell AD, Brandner S, Jefferys JG, Collinge J.** 2007. Targeting cellular prion protein reverses early cognitive deficits and neurophysiological dysfunction in prion-infected mice. *Neuron* **53**:325-335.
243. **Solfrosi L, Criado JR, McGavern DB, Wirz S, Sanchez-Alavez M, Sugama S, DeGiorgio LA, Volpe BT, Wiseman E, Abalos G, Masliah E, Gilden D, Oldstone MB, Conti B, Williamson RA.** 2004. Cross-linking cellular prion protein triggers neuronal apoptosis in vivo. *Science* **303**:1514-1516.

REFERENCIAS

244. **Kristiansen M, Messenger MJ, Klohn PC, Brandner S, Wadsworth JD, Collinge J, Tabrizi SJ.** 2005. Disease-related prion protein forms aggregates in neuronal cells leading to caspase activation and apoptosis. *J Biol Chem* **280**:38851-38861.
245. **Ma J, Wollmann R, Lindquist S.** 2002. Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol. *Science* **298**:1781-1785.
246. **Silveira JR, Raymond GJ, Hughson AG, Race RE, Sim VL, Hayes SF, Caughey B.** 2005. The most infectious prion protein particles. *Nature* **437**:257-261.
247. **Simoneau S, Rezaei H, Sales N, Kaiser-Schulz G, Lefebvre-Roque M, Vidal C, Fournier JG, Comte J, Wopfner F, Grosclaude J, Schatzl H, Lasmezas CI.** 2007. In vitro and in vivo neurotoxicity of prion protein oligomers. *PLoS Pathog* **3**:e125.
248. **Tixador P, Herzog L, Reine F, Jaumain E, Chapuis J, Le Dur A, Laude H, Beringue V.** 2010. The physical relationship between infectivity and prion protein aggregates is strain-dependent. *PLoS Pathog* **6**:e1000859.
249. **Caughey B, Lansbury PT.** 2003. Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci* **26**:267-298.
250. **McKinley MP, Masiarz FR, Prusiner SB.** 1981. Reversible chemical modification of the scrapie agent. *Science* **214**:1259-1261.
251. **Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB.** 1982. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* **218**:1309-1311.
252. **Caughey B, Baron GS, Chesebro B, Jeffrey M.** 2009. Getting a grip on prions: oligomers, amyloids, and pathological membrane interactions. *Annu Rev Biochem* **78**:177-204.
253. **Prusiner SB, Scott M, Foster D, Pan KM, Groth D, Mirinda C, Torchia M, Yang SL, Serban D, Carlson GA, et al.** 1990. Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell* **63**:673-686.
254. **Meier P, Genoud N, Prinz M, Maissen M, Rulicke T, Zurbriggen A, Raeber AJ, Aguzzi A.** 2003. Soluble dimeric prion protein binds PrP(Sc) in vivo and antagonizes prion disease. *Cell* **113**:49-60.
255. **Horiuchi M, Priola SA, Chabry J, Caughey B.** 2000. Interactions between heterologous forms of prion protein: binding, inhibition of conversion, and species barriers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:5836-5841.
256. **Prusiner SB.** 1991. Molecular biology of prion diseases. *Science* **252**:1515-1522.
257. **Zukas AA, Bruederle CE, Carter JM.** 2008. Sonication induced intermediate in prion protein conversion. *Protein Pept Lett* **15**:206-211.
258. **Jarrett JT, Lansbury PT, Jr.** 1993. Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* **73**:1055-1058.
259. **Masel J, Jansen VA.** 2001. The measured level of prion infectivity varies in a predictable way according to the aggregation state of the infectious agent. *Biochim Biophys Acta* **1535**:164-173.
260. **Castellani RJ, Lee HG, Siedlak SL, Nunomura A, Hayashi T, Nakamura M, Zhu X, Perry G, Smith MA.** 2009. Reexamining Alzheimer's disease: evidence for a protective role for amyloid-beta protein precursor and amyloid-beta. *J Alzheimers Dis* **18**:447-452.
261. **Eigen M.** 1996. Prionics or the kinetic basis of prion diseases. *Biophys Chem* **63**:A1-18.
262. **Safar J, Roller PP, Gajdusek DC, Gibbs CJ, Jr.** 1993. Thermal stability and conformational transitions of scrapie amyloid (prion) protein correlate with infectivity. *Protein Sci* **2**:2206-2216.
263. **Masel J, Jansen VA.** 1999. The kinetics of proteinase K digestion of linear prion polymers. *Proc Biol Sci* **266**:1927-1931.
264. **Watzky MA, Finke RG.** 1997. Transition Metal Nanocluster Formation Kinetic and Mechanistic Studies. A New Mechanism When Hydrogen Is the Reductant: Slow, Continuous Nucleation and Fast Autocatalytic Surface Growth. *J Am Chem Soc* **119**, **43**:10382-10400.
265. **Rezaei H.** 2008. Prion protein oligomerization. *Curr Alzheimer Res* **5**:572-578.

REFERENCIAS

266. **Zhang H, Stockel J, Mehlhorn I, Groth D, Baldwin MA, Prusiner SB, James TL, Cohen FE.** 1997. Physical studies of conformational plasticity in a recombinant prion protein. *Biochemistry* **36**:3543-3553.
267. **Stohr J, Weinmann N, Wille H, Kaimann T, Nagel-Steger L, Birkmann E, Panza G, Prusiner SB, Eigen M, Riesner D.** 2008. Mechanisms of prion protein assembly into amyloid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:2409-2414.
268. **Baskakov IV, Legname G, Baldwin MA, Prusiner SB, Cohen FE.** 2002. Pathway complexity of prion protein assembly into amyloid. *J Biol Chem* **277**:21140-21148.
269. **Prigent S, Rezaei H.** 2011. PrP assemblies: spotting the responsible regions in prion propagation. *Prion* **5**:69-75.
270. **Sang JC, Lee CY, Luh FY, Huang YW, Chiang YW, Chen RP.** 2012. Slow spontaneous alpha-to-beta structural conversion in a non-denaturing neutral condition reveals the intrinsically disordered property of the disulfide-reduced recombinant mouse prion protein. *Prion* **6**:489-497.
271. **Bishop MF, Ferrone FA.** 1984. Kinetics of nucleation-controlled polymerization. A perturbation treatment for use with a secondary pathway. *Biophys J* **46(5)**:631-644.
272. **Le Dur A, Beringue V, Andreoletti O, Reine F, Lai TL, Baron T, Bratberg B, Vilotte JL, Sarradin P, Benestad SL, Laude H.** 2005. A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:16031-16036.
273. **Sandberg MK, Al-Doujaily H, Sharps B, Clarke AR, Collinge J.** 2011. Prion propagation and toxicity in vivo occur in two distinct mechanistic phases. *Nature* **470**:540-542.
274. **Igel-Egalon A, Bohl J, Moudjou M, Herzog L, Reine F, Rezaei H, Beringue V.** 2019. Heterogeneity and Architecture of Pathological Prion Protein Assemblies: Time to Revisit the Molecular Basis of the Prion Replication Process? *Viruses* **11**.
275. **Collinge J, Clarke AR.** 2007. A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science* **318**:930-936.
276. **Torrent J, Lange R, Igel-Egalon A, Béringue V, Rezaei H.** 2016. Getting to the core of prion superstructural variability. *Prion* **10(1)**:1-8.
277. **Doumic M, Fellner K, Mezache M, Rezaei H.** 2019. A bi-monomeric, nonlinear Becker-Doring-type system to capture oscillatory aggregation kinetics in prion dynamics. *J Theor Biol* **480**:241-261.
278. **Joseph J, Maji SK, Padinhateeri R.** 2020. Computational Model for Studying Breakage-Dependent Amyloid Growth. *ACS Chem Neurosci* **11**:3615-3622.
279. **Hirschberger T, Stork M, Schropp B, Winklhofer KF, Tatzelt J, Tavan P.** 2006. Structural instability of the prion protein upon M205S/R mutations revealed by molecular dynamics simulations. *Biophys J* **90**:3908-3918.
280. **Alonso DO, An C, Daggett V.** 2002. Simulations of biomolecules: Characterization of the early steps in the pH-induced conformational conversion of the hamster, bovine and human forms of the prion protein. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* **360**:1165-1178.
281. **van der Kamp MW, Daggett V.** 2011. Molecular dynamics as an approach to study prion protein misfolding and the effect of pathogenic mutations. *Top Curr Chem* **305**:169-197.
282. **Spagnoli G, Rigoli M, Novi Inverardi G, Codeseira YB, Biasini E, Requena JR.** 2020. Modeling PrP(Sc) Generation Through Deformed Templating. *Front Bioeng Biotechnol* **8**:590501.
283. **Fox KA, Jewell JE, Williams ES, Miller MW.** 2006. Patterns of PrPCWD accumulation during the course of chronic wasting disease infection in orally inoculated mule deer (*Odocoileus hemionus*). *J Gen Virol* **87**:3451-3461.
284. **Anderson RM, Donnelly CA, Ferguson NM, Woolhouse ME, Watt CJ, Udy HJ, MaWhinney S, Dunstan SP, Southwood TR, Wilesmith JW, Ryan JB, Hoinville LJ, Hillerton JE, Austin AR, Wells GA.** 1996. Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature* **382**:779-788.

REFERENCIAS

285. **Hilton DA.** 2006. Pathogenesis and prevalence of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Pathol* **208**:134-141.
286. **Kimberlin RH, Walker CA.** 1979. Pathogenesis of mouse scrapie: dynamics of agent replication in spleen, spinal cord and brain after infection by different routes. *J Comp Pathol* **89**:551-562.
287. **Fraser H.** 1982. Neuronal spread of scrapie agent and targeting of lesions within the retino-tectal pathway. *Nature* **295**:149-150.
288. **Bartz JC, Kincaid AE, Bessen RA.** 2003. Rapid prion neuroinvasion following tongue infection. *J Virol* **77**:583-591.
289. **Taylor DM, McConnell I, Fraser H.** 1996. Scrapie infection can be established readily through skin scarification in immunocompetent but not immunodeficient mice. *J Gen Virol* **77 (Pt 7)**:1595-1599.
290. **McBride PA, Schulz-Schaeffer WJ, Donaldson M, Bruce M, Diring H, Kretzschmar HA, Beekes M.** 2001. Early spread of scrapie from the gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibers of the splanchnic and vagus nerves. *J Virol* **75**:9320-9327.
291. **Aguzzi A, Nuvolone M, Zhu C.** 2013. The immunobiology of prion diseases. *Nat Rev Immunol* **13**:888-902.
292. **Fraser H, Dickinson AG.** 1970. Pathogenesis of scrapie in the mouse: the role of the spleen. *Nature* **226**:462-463.
293. **Cashman NR, Loertscher R, Nalbantoglu J, Shaw I, Kascsak RJ, Bolton DC, Bendheim PE.** 1990. Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell* **61**:185-192.
294. **Lasmezas CI, Cesbron JY, Deslys JP, Demaimay R, Adjou KT, Rioux R, Lemaire C, Loch C, Dormont D.** 1996. Immune system-dependent and -independent replication of the scrapie agent. *J Virol* **70**:1292-1295.
295. **Kimberlin RH, Walker CA.** 1978. Pathogenesis of mouse scrapie: effect of route of inoculation on infectivity titres and dose-response curves. *J Comp Pathol* **88**:39-47.
296. **Heppner FL, Christ AD, Klein MA, Prinz M, Fried M, Kraehenbuhl JP, Aguzzi A.** 2001. Transepithelial prion transport by M cells. *Nat Med* **7**:976-977.
297. **Donaldson DS, Kobayashi A, Ohno H, Yagita H, Williams IR, Mabbott NA.** 2012. M cell-depletion blocks oral prion disease pathogenesis. *Mucosal Immunol* **5**:216-225.
298. **Kujala P, Raymond CR, Romeijn M, Godsavé SF, van Kasteren SI, Wille H, Prusiner SB, Mabbott NA, Peters PJ.** 2011. Prion uptake in the gut: identification of the first uptake and replication sites. *PLoS Pathog* **7**:e1002449.
299. **Mishra RS, Basu S, Gu Y, Luo X, Zou WQ, Mishra R, Li R, Chen SG, Gambetti P, Fujioka H, Singh N.** 2004. Protease-resistant human prion protein and ferritin are cotransported across Caco-2 epithelial cells: implications for species barrier in prion uptake from the intestine. *J Neurosci* **24**:11280-11290.
300. **Morel E, Andrieu T, Casagrande F, Gauczynski S, Weiss S, Grassi J, Rousset M, Dormont D, Chambaz J.** 2005. Bovine prion is endocytosed by human enterocytes via the 37 kDa/67 kDa laminin receptor. *Am J Pathol* **167**:1033-1042.
301. **Huang FP, Farquhar CF, Mabbott NA, Bruce ME, MacPherson GG.** 2002. Migrating intestinal dendritic cells transport PrP(Sc) from the gut. *J Gen Virol* **83**:267-271.
302. **Kitamoto T, Muramoto T, Mohri S, Doh-Ura K, Tateishi J.** 1991. Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Virol* **65**:6292-6295.
303. **Mabbott NA, MacPherson GG.** 2006. Prions and their lethal journey to the brain. *Nat Rev Microbiol* **4**:201-211.

REFERENCIAS

304. **Glatzel M, Heppner FL, Albers KM, Aguzzi A.** 2001. Sympathetic innervation of lymphoreticular organs is rate limiting for prion neuroinvasion. *Neuron* **31**:25-34.
305. **Prinz M, Heikenwalder M, Junt T, Schwarz P, Glatzel M, Heppner FL, Fu YX, Lipp M, Aguzzi A.** 2003. Positioning of follicular dendritic cells within the spleen controls prion neuroinvasion. *Nature* **425**:957-962.
306. **Flechsig E, Hegyi I, Enari M, Schwarz P, Collinge J, Weissmann C.** 2001. Transmission of scrapie by steel-surface-bound prions. *Mol Med* **7**:679-684.
307. **Defaweux V, Dorban G, Démonceau C, Piret J, Jolois O, Thellin O, Thielen C, Heinen E, Antoine N.** 2005. Interfaces between dendritic cells, other immune cells, and nerve fibres in mouse Peyer's patches: potential sites for neuroinvasion in prion diseases. *Microsc Res Tech* **66**:1-9.
308. **Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W, Vidal M, Laude H, Raposo G.** 2004. Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:9683-9688.
309. **Heikenwalder M, Julius C, Aguzzi A.** 2007. Prions and peripheral nerves: a deadly rendezvous. *J Neurosci Res* **85**:2714-2725.
310. **Kimberlin RH, Field HJ, Walker CA.** 1983. Pathogenesis of mouse scrapie: evidence for spread of infection from central to peripheral nervous system. *J Gen Virol* **64 Pt 3**:713-716.
311. **Kraus A, Groveman BR, Caughey B.** 2013. Prions and the potential transmissibility of protein misfolding diseases. *Annu Rev Microbiol* **67**:543-564.
312. **Bartz JC, Dejoia C, Tucker T, Kincaid AE, Bessen RA.** 2005. Extraneural prion neuroinvasion without lymphoreticular system infection. *J Virol* **79**:11858-11863.
313. **Ayers JI, Kincaid AE, Bartz JC.** 2009. Prion strain targeting independent of strain-specific neuronal tropism. *J Virol* **83**:81-87.
314. **Igel-Egalon A, Beringue V, Rezaei H, Sibille P.** 2018. Prion Strains and Transmission Barrier Phenomena. *Pathogens* **7**.
315. **Rossi M, Baiardi S, Parchi P.** 2019. Understanding Prion Strains: Evidence from Studies of the Disease Forms Affecting Humans. *Viruses* **11**.
316. **Caughey B, Raymond GJ, Bessen RA.** 1998. Strain-dependent differences in beta-sheet conformations of abnormal prion protein. *J Biol Chem* **273**:32230-32235.
317. **Lowenstein DH, Butler DA, Westaway D, McKinley MP, DeArmond SJ, Prusiner SB.** 1990. Three hamster species with different scrapie incubation times and neuropathological features encode distinct prion proteins. *Mol Cell Biol* **10**:1153-1163.
318. **Scialo C, De Cecco E, Manganotti P, Legname G.** 2019. Prion and Prion-Like Protein Strains: Deciphering the Molecular Basis of Heterogeneity in Neurodegeneration. *Viruses* **11**.
319. **Dickinson AG.** 1976. Scrapie in sheep and goats. *Front Biol* **44**:209-241.
320. **Bruce ME.** 2003. TSE strain variation. *Br Med Bull* **66**:99-108.
321. **Zlotnik I, Grant DP, Dayan A-D, Earl C.** 1974. Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from man to squirrel monkey. *Lancet* **2(7878)**:435-438.
322. **Espana C, Gajdusek C, Gibbs C, Osburn B, Gribble D, Cardinet G, Chanock R.** 1975. Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease to the stump-tail macaque (*Macaca arctoides*). *Proc Soc Exp Biol Med* **149(3)**:723-724.
323. **Hartsough GR, Burger D.** 1965. Encephalopathy of mink. I. Epizootiologic and clinical observations. *J Infect Dis* **115(4)**:387-392.
324. **Marsh RF, Bessen RA, Lehmann S, Hartsough GR.** 1991. Epidemiological and experimental studies on a new incident of transmissible mink encephalopathy. *J Gen Virol* **72 (Pt 3)**:589-594.
325. **Williams ES, Young S.** 1980. Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J Wildl Dis* **16**:89-98.
326. **Huor A, Espinosa JC, Vidal E, Cassard H, Douet JY, Lugan S, Aron N, Marin-Moreno A, Lorenzo P, Aguilar-Calvo P, Badiola J, Bolea R, Pumarola M, Benestad SL, Orge L, Thackray AM, Bujdoso R,**

REFERENCIAS

- Torres JM, Androletti O.** 2019. The emergence of classical BSE from atypical/Nor98 scrapie. *Proc Natl Acad Sci U S A* doi:10.1073/pnas.1915737116.
327. **Schreuder BE.** 1994. Animal spongiform encephalopathies--an update. Part II. Bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Vet Q* **16**:182-192.
328. **Scott MR, Will R, Ironside J, Nguyen HO, Tremblay P, DeArmond SJ, Prusiner SB.** 1999. Compelling transgenetic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:15137-15142.
329. **Kirkwood JK, Wells GA, Wilesmith JW, Cunningham AA, Jackson SI.** 1990. Spongiform encephalopathy in an arabian oryx (*Oryx leucoryx*) and a greater kudu (*Tragelaphus strepsiceros*). *Vet Rec* **127**:418-420.
330. **Imran M, Mahmood S.** 2011. An overview of human prion diseases. *Virology* **8**:559.
331. **Ryder SJ, Wells GA, Bradshaw JM, Pearson GR.** 2001. Inconsistent detection of PrP in extraneural tissues of cats with feline spongiform encephalopathy. *Vet Rec* **148**:437-441.
332. **Barlow RM, Rennie JC.** 1976. The fate of ME7 scrapie infection in rats, guinea-pigs and rabbits. *Res Vet Sci* **21**:110-111.
333. **Bessen RA, Marsh RF.** 1992. Identification of two biologically distinct strains of transmissible mink encephalopathy in hamsters. *J Gen Virol* **73 (Pt 2)**:329-334.
334. **Bessen RA, Marsh RF.** 1994. Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J Virol* **68**:7859-7868.
335. **Carlson GA, Goodman PA, Lovett M, Taylor BA, Marshall ST, Peterson-Torchia M, Westaway D, Prusiner SB.** 1988. Genetics and polymorphism of the mouse prion gene complex: control of scrapie incubation time. *Mol Cell Biol* **8**:5528-5540.
336. **Goldmann W.** 2008. PrP genetics in ruminant transmissible spongiform encephalopathies. *Vet Res* **39**:30.
337. **Laude H, Vilette D, Le Dur A, Archer F, Soulier S.** 2002. New in vivo and ex vivo models for the experimental study of sheep scrapie: development and perspectives. *Comptes Rendus Biologies* **325**:49-57.
338. **Scott M, Groth D, Foster D, Torchia M, Yang SL, DeArmond SJ, Prusiner SB.** 1993. Propagation of prions with artificial properties in transgenic mice expressing chimeric PrP genes. *Cell* **73**:979-988.
339. **Bartz JC, Marsh RF, McKenzie DI, Aiken JM.** 1998. The host range of chronic wasting disease is altered on passage in ferrets. *Virology* **251**:297-301.
340. **Watts JC, Giles K, Patel S, Oehler A, DeArmond SJ, Prusiner SB.** 2014. Evidence that bank vole PrP is a universal acceptor for prions. *PLoS Pathog* **10**:e1003990.
341. **Mahal SP, Baker CA, Demczyk CA, Smith EW, Julius C, Weissmann C.** 2007. Prion strain discrimination in cell culture: the cell panel assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:20908-20913.
342. **Li J, Browning S, Mahal SP, Oelschlegel AM, Weissmann C.** 2010. Darwinian evolution of prions in cell culture. *Science* **327**:869-872.
343. **Kocisko DA, Priola SA, Raymond GJ, Chesebro B, Lansbury PT, Jr., Caughey B.** 1995. Species specificity in the cell-free conversion of prion protein to protease-resistant forms: a model for the scrapie species barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:3923-3927.
344. **Fernandez-Borges N, de Castro J, Castilla J.** 2009. In vitro studies of the transmission barrier. *Prion* **3**:220-223.
345. **Castilla J, Gonzalez-Romero D, Saa P, Morales R, De Castro J, Soto C.** 2008. Crossing the species barrier by PrP(Sc) replication in vitro generates unique infectious prions. *Cell* **134**:757-768.
346. **Green KM, Castilla J, Seward TS, Napier DL, Jewell JE, Soto C, Telling GC.** 2008. Accelerated high fidelity prion amplification within and across prion species barriers. *PLoS Pathog* **4**:e1000139.
347. **Krakauer DC, Pagel M, Southwood TR, Zanotto PM.** 1996. Phylogenesis of prion protein. *Nature* **380**:675.

REFERENCIAS

348. **Gossert AD, Bonjour S, Lysek DA, Fiorito F, Wuthrich K.** 2005. Prion protein NMR structures of elk and of mouse/elk hybrids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:646-650.
349. **Perez DR, Damberger FF, Wuthrich K.** 2010. Horse prion protein NMR structure and comparisons with related variants of the mouse prion protein. *J Mol Biol* **400**:121-128.
350. **Vorberg I, Groschup MH, Pfaff E, Priola SA.** 2003. Multiple amino acid residues within the rabbit prion protein inhibit formation of its abnormal isoform. *J Virol* **77**:2003-2009.
351. **Billeter M, Riek R, Wider G, Hornemann S, Glockshuber R, Wuthrich K.** 1997. Prion protein NMR structure and species barrier for prion diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:7281-7285.
352. **Fernandez-Borges N, Parra B, Vidal E, Erana H, Sanchez-Martin MA, de Castro J, Elezgarai SR, Pumarola M, Mayoral T, Castilla J.** 2017. Unraveling the key to the resistance of canids to prion diseases. *PLoS Pathog* **13**:e1006716.
353. **Vidal E, Fernandez-Borges N, Erana H, Parra B, Pintado B, Sanchez-Martin MA, Charco JM, Ordonez M, Perez-Castro MA, Pumarola M, Mathiason CK, Mayoral T, Castilla J.** 2020. Dogs are resistant to prion infection, due to the presence of aspartic or glutamic acid at position 163 of their prion protein. *FASEB J* **34**:3969-3982.
354. **Wen Y, Li J, Xiong M, Peng Y, Yao W, Hong J, Lin D.** 2010. Solution structure and dynamics of the I214V mutant of the rabbit prion protein. *PLoS One* **5**:e13273.
355. **Wen Y, Li J, Yao W, Xiong M, Hong J, Peng Y, Xiao G, Lin D.** 2010. Unique structural characteristics of the rabbit prion protein. *J Biol Chem* **285**:31682-31693.
356. **Race RE, Fadness LH, Chesebro B.** 1987. Characterization of scrapie infection in mouse neuroblastoma cells. *J Gen Virol* **68 (Pt 5)**:1391-1399.
357. **Priola SA, Chesebro B.** 1995. A single hamster PrP amino acid blocks conversion to protease-resistant PrP in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells. *J Virol* **69**:7754-7758.
358. **Priola SA.** 2018. Cell biology of prion infection. *Handb Clin Neurol* **153**:45-68.
359. **Krauss S, Vorberg I.** 2013. Prions Ex Vivo: What Cell Culture Models Tell Us about Infectious Proteins. *Int J Cell Biol* **2013**:704546.
360. **Barret A, Tagliavini F, Forloni G, Bate C, Salmona M, Colombo L, De Luigi A, Limido L, Suardi S, Rossi G, Auvre F, Adjou KT, Sales N, Williams A, Lasmezas C, Deslys JP.** 2003. Evaluation of quinacrine treatment for prion diseases. *J Virol* **77**:8462-8469.
361. **Kocisko DA, Come JH, Priola SA, Chesebro B, Raymond GJ, Lansbury PT, Caughey B.** 1994. Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* **370**:471-474.
362. **Caughey WS, Raymond LD, Horiuchi M, Caughey B.** 1998. Inhibition of protease-resistant prion protein formation by porphyrins and phthalocyanines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:12117-12122.
363. **Hill AF, Antoniou M, Collinge J.** 1999. Protease-resistant prion protein produced in vitro lacks detectable infectivity. *J Gen Virol* **80 (Pt 1)**:11-14.
364. **Wilham JM, Orru CD, Bessen RA, Atarashi R, Sano K, Race B, Meade-White KD, Taubner LM, Timmes A, Caughey B.** 2010. Rapid end-point quantitation of prion seeding activity with sensitivity comparable to bioassays. *PLoS Pathog* **6**:e1001217.
365. **McGuire LI, Poleggi A, Poggiolini I, Suardi S, Grznarova K, Shi S, de Vil B, Sarros S, Satoh K, Cheng K, Cramm M, Fairfoul G, Schmitz M, Zerr I, Cras P, Equestre M, Tagliavini F, Atarashi R, Knox D, Collins S, Haik S, Parchi P, Pocchiari M, Green A.** 2016. Cerebrospinal fluid real-time quaking-induced conversion is a robust and reliable test for sporadic creutzfeldt-jakob disease: An international study. *Ann Neurol* **80**:160-165.
366. **John TR, Schatzl HM, Gilch S.** 2013. Early detection of chronic wasting disease prions in urine of pre-symptomatic deer by real-time quaking-induced conversion assay. *Prion* **7**:253-258.
367. **Orru CD, Bongianini M, Tonoli G, Ferrari S, Hughson AG, Groveman BR, Fiorini M, Pocchiari M, Monaco S, Caughey B, Zanusso G.** 2014. A test for Creutzfeldt-Jakob disease using nasal brushings. *N Engl J Med* **371**:519-529.

REFERENCIAS

368. **Erana H, Charco JM, Gonzalez-Miranda E, Garcia-Martinez S, Lopez-Moreno R, Perez-Castro MA, Diaz-Dominguez CM, Garcia-Salvador A, Castilla J.** 2020. Detection of Pathognomonic Biomarker PrP(Sc) and the Contribution of Cell Free-Amplification Techniques to the Diagnosis of Prion Diseases. *Biomolecules* **10**.
369. **Saijo E, Groveman BR, Kraus A, Metrick M, Orru CD, Hughson AG, Caughey B.** 2019. Ultrasensitive RT-QuIC Seed Amplification Assays for Disease-Associated Tau, alpha-Synuclein, and Prion Aggregates. *Methods Mol Biol* **1873**:19-37.
370. **Atarashi R, Wilham JM, Christensen L, Hughson AG, Moore RA, Johnson LM, Onwubiko HA, Priola SA, Caughey B.** 2008. Simplified ultrasensitive prion detection by recombinant PrP conversion with shaking. *Nat Methods* **5**:211-212.
371. **Saa P, Castilla J, Soto C.** 2005. Cyclic amplification of protein misfolding and aggregation. *Methods Mol Biol* **299**:53-65.
372. **Telling G.** 2001. Protein-based PCR for prion diseases? *Nat Med* **7**:778-779.
373. **Meyerett C, Michel B, Pulford B, Spraker TR, Nichols TA, Johnson T, Kurt T, Hoover EA, Telling GC, Zabel MD.** 2008. In vitro strain adaptation of CWD prions by serial protein misfolding cyclic amplification. *Virology* **382**:267-276.
374. **Kurt TD, Perrott MR, Wilusz CJ, Wilusz J, Supattapone S, Telling GC, Zabel MD, Hoover EA.** 2007. Efficient in vitro amplification of chronic wasting disease PrPRES. *J Virol* **81**:9605-9608.
375. **Sigurdson CJ, Manco G, Schwarz P, Liberski P, Hoover EA, Hornemann S, Polymenidou M, Miller MW, Glatzel M, Aguzzi A.** 2006. Strain fidelity of chronic wasting disease upon murine adaptation. *J Virol* **80**:12303-12311.
376. **Nicoll AJ, Trevitt CR, Tattum MH, Risse E, Quarterman E, Ibarra AA, Wright C, Jackson GS, Sessions RB, Farrow M, Waltho JP, Clarke AR, Collinge J.** 2010. Pharmacological chaperone for the structured domain of human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:17610-17615.
377. **Fernandez-Borges N, Di Bari MA, Erana H, Sanchez-Martin M, Pirisinu L, Parra B, Elezgarai SR, Vanni I, Lopez-Moreno R, Vaccari G, Venegas V, Charco JM, Gil D, Harrathi C, D'Agostino C, Agrimi U, Mayoral T, Requena JR, Nonno R, Castilla J.** 2017. Cofactors influence the biological properties of infectious recombinant prions. *Acta Neuropathol* doi:10.1007/s00401-017-1782-y.
378. **Saa P, Castilla J, Soto C.** 2006. Ultra-efficient replication of infectious prions by automated protein misfolding cyclic amplification. *J Biol Chem* **281**:35245-35252.
379. **Kim JI, Cali I, Surewicz K, Kong Q, Raymond GJ, Atarashi R, Race B, Qing L, Gambetti P, Caughey B, Surewicz WK.** 2010. Mammalian prions generated from bacterially expressed prion protein in the absence of any mammalian cofactors. *J Biol Chem* **285**:14083-14087.
380. **Priola SA, McNally KL.** 2009. The role of the prion protein membrane anchor in prion infection. *Prion* **3**:134-138.
381. **Deleault NR, Lucassen RW, Supattapone S.** 2003. RNA molecules stimulate prion protein conversion. *Nature* **425**:717-720.
382. **Deleault NR, Piro JR, Walsh DJ, Wang F, Ma J, Geoghegan JC, Supattapone S.** 2012. Isolation of phosphatidylethanolamine as a solitary cofactor for prion formation in the absence of nucleic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**:8546-8551.
383. **Erana H, Charco JM, Di Bari MA, Diaz-Dominguez CM, Lopez-Moreno R, Vidal E, Gonzalez-Miranda E, Perez-Castro MA, Garcia-Martinez S, Bravo S, Fernandez-Borges N, Geijo M, D'Agostino C, Garrido J, Bian J, Konig A, Uluca-Yazgi B, Sabate R, Khaychuk V, Vanni I, Telling GC, Heise H, Nonno R, Requena JR, Castilla J.** 2019. 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* **15**:e1008117.
384. **Ladner-Keay CL, Griffith BJ, Wishart DS.** 2014. Shaking alone induces de novo conversion of recombinant prion proteins to beta-sheet rich oligomers and fibrils. *PLoS One* **9**:e98753.

REFERENCIAS

385. **Charco JM.** 2018. 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 / Euskal Herriko Unibersitatea.
386. **González-Miranda E.** 2020. 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 / Euskal Herriko Unibersitatea.
387. **Erana H, Perez-Castro MA, Garcia-Martinez S, Charco JM, Lopez-Moreno R, Diaz-Dominguez CM, Barrio T, Gonzalez-Miranda E, Castilla J.** 2020. A Novel, Reliable and Highly Versatile Method to Evaluate Different Prion Decontamination Procedures. *Front Bioeng Biotechnol* **8**:589182.
388. **Haley NJ, Hoover EA.** 2015. Chronic wasting disease of cervids: current knowledge and future perspectives. *Annu Rev Anim Biosci* **3**:305-325.
389. **Benestad SL, Mitchell G, Simmons M, Ytrehus B, Vikoren T.** 2016. First case of chronic wasting disease in Europe in a Norwegian free-ranging reindeer. *Vet Res* **47**:88.
390. **Kahn S, Dube C, Bates L, Balachandran A.** 2004. Chronic wasting disease in Canada: Part 1. *Can Vet J* **45**:397-404.
391. **Novakofski J, Brewer MS, Mateus-Pinilla N, Killefer J, McCusker RH.** 2005. Prion biology relevant to bovine spongiform encephalopathy. *J Anim Sci* **83**:1455-1476.
392. **Williams ES.** 2005. Chronic wasting disease. *Vet Pathol* **42**:530-549.
393. **Sigurdson CJ, Aguzzi A.** 2007. Chronic wasting disease. *Biochim Biophys Acta* **1772**:610-618.
394. **Miller MW, Williams ES.** 2003. Prion disease: horizontal prion transmission in mule deer. *Nature* **425**:35-36.
395. **Hamir AN, Cutlip RC, Miller JM, Williams ES, Stack MJ, Miller MW, O'Rourke KI, Chaplin MJ.** 2001. Preliminary findings on the experimental transmission of chronic wasting disease agent of mule deer to cattle. *J Vet Diagn Invest* **13**:91-96.
396. **Hamir AN, Kunkle RA, Cutlip RC, Miller JM, Williams ES, Richt JA.** 2006. Transmission of chronic wasting disease of mule deer to Suffolk sheep following intracerebral inoculation. *J Vet Diagn Invest* **18**:558-565.
397. **Hamir AN, Miller JM, Cutlip RC, Kunkle RA, Jenny AL, Stack MJ, Chaplin MJ, Richt JA.** 2004. Transmission of sheep scrapie to elk (*Cervus elaphus nelsoni*) by intracerebral inoculation: final outcome of the experiment. *J Vet Diagn Invest* **16**:316-321.
398. **Berrow NS, Alderton D, Sainsbury S, Nettleship J, Assenberg R, Rahman N, Stuart DI, Owens RJ.** 2007. A versatile ligation-independent cloning method suitable for high-throughput expression screening applications. *Nucleic Acids Res* **35**:e45.
399. **Inoue H, Nojima H, Okayama H.** 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**:23-28.
400. **Fernández-Borges N, Di Bari MA, Erana H, Sanchez-Martin M, Pirisinu L, Parra B, Elezgarai SR, Vanni I, Lopez-Moreno R, Vaccari G, Venegas V, Charco JM, Gil D, Harrathi C, D'Agostino C, Agrimi U, Mayoral T, Requena JR, Nonno R, Castilla J.** 2017. Cofactors influence the biological properties of infectious recombinant prions. *Acta Neuropathol* doi:10.1007/s00401-017-1782-y.
401. **Pritzkow S.** 2022. Transmission, Strain Diversity, and Zoonotic Potential of Chronic Wasting Disease. *Viruses* **14**.
402. **Pirisinu L, Tran L, Chiappini B, Vanni I, Di Bari MA, Vaccari G, Vikoren T, Madslie KI, Vage J, Spraker T, Mitchell G, Balachandran A, Baron T, Casalone C, Rolandsen CM, Roed KH, Agrimi U, Nonno R, Benestad SL.** 2018. Novel Type of Chronic Wasting Disease Detected in Moose (*Alces alces*), Norway. *Emerg Infect Dis* **24**:2210-2218.
403. **Moazami-Goudarzi K, Andréoletti O, Vilotte J-L, Béringue V.** 2021. Review on PRNP genetics and susceptibility to chronic wasting disease of Cervidae. *Veterinary Research* **52**:128.

REFERENCIAS

404. **Bian J, Kim S, Kane SJ, Crowell J, Sun JL, Christiansen J, Saijo E, Moreno JA, DiLisio J, Burnett E, Pritzkow S, Gorski D, Soto C, Kreeger TJ, Balachandran A, Mitchell G, Miller MW, Nonno R, Vikøren T, Våge J, Madslie K, Tran L, Vuong TT, Benestad SL, Telling GC.** 2021. Adaptive selection of a prion strain conformer corresponding to established North American CWD during propagation of novel emergent Norwegian strains in mice expressing elk or deer prion protein. *PLOS Pathogens* **17**:e1009748.
405. **Edgeworth JA, Jackson GS, Clarke AR, Weissmann C, Collinge J.** 2009. Highly sensitive, quantitative cell-based assay for prions adsorbed to solid surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:3479-3483.
406. **Green KM, Browning SR, Seward TS, Jewell JE, Ross DL, Green MA, Williams ES, Hoover EA, Telling GC.** 2008. The elk PRNP codon 132 polymorphism controls cervid and scrapie prion propagation. *J Gen Virol* **89**:598-608.
407. **Moore J, Tatum T, Hwang S, Vrentas C, West Greenlee MH, Kong Q, Nicholson E, Greenlee J.** 2020. Novel Strain of the Chronic Wasting Disease Agent Isolated From Experimentally Inoculated Elk With LL132 Prion Protein. *Scientific Reports* **10**.
408. **Kurt TD, Jiang L, Fernandez-Borges N, Bett C, Liu J, Yang T, Spraker TR, Castilla J, Eisenberg D, Kong Q, Sigurdson CJ.** 2015. Human prion protein sequence elements impede cross-species chronic wasting disease transmission. *J Clin Invest* **125**:1485-1496.
409. **Hoyt F, Standke HG, Artikis E, Schwartz CL, Hansen B, Li K, Hughson AG, Manca M, Thomas OR, Raymond GJ, Race B, Baron GS, Caughey B, Kraus A.** 2022. Cryo-EM structure of anchorless RML prion reveals variations in shared motifs between distinct strains. *Nat Commun* **13**:4005.
410. **Caughey B, Standke HG, Artikis E, Hoyt F, Kraus A.** 2022. Pathogenic prion structures at high resolution. *PLoS Pathog* **18**:e1010594.
411. **Fernandez-Borges N, Castilla J.** 2010. PMCA. A Decade of In Vitro Prion Replication. *Current Chemical Biology* **4**:200-207.
412. **Gonzalez-Montalban N, Makarava N, Ostapchenko VG, Savtchenk R, Alexeeva I, Rohwer RG, Baskakov IV.** 2011. Highly efficient protein misfolding cyclic amplification. *PLoS Pathog* **7**:e1001277.
413. **Johnson CJ, Aiken JM, McKenzie D, Samuel MD, Pedersen JA.** 2012. Highly efficient amplification of chronic wasting disease agent by protein misfolding cyclic amplification with beads (PMCAb). *PLoS One* **7**:e35383.
414. **Kovalchuk Ben-Zaken O, Nissan I, Tzaban S, Taraboulos A, Zcharia E, Matzger S, Shafat I, Vlodavsky I, Tal Y.** 2015. Transgenic over-expression of mammalian heparanase delays prion disease onset and progression. *Biochem Biophys Res Commun* **464**:698-704.
415. **Brazier MW, Volitakis I, Kvasnicka M, White AR, Underwood JR, Green JE, Han S, Hill AF, Masters CL, Collins SJ.** 2010. Manganese chelation therapy extends survival in a mouse model of M1000 prion disease. *J Neurochem* **114**:440-451.
416. **Gomori AJ, Partnow MJ, Horoupian DS, Hirano A.** 1973. The ataxic form of Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol* **29(5)**:318-323.
417. **Brown P, Rodgers-Johnson P, Cathala F, Gibbs C, Gajdusek C.** 1984. Creutzfeldt-Jakob Disease of Long Duration: Clinicopathological Characteristics, Transmissibility and Differential Diagnosis. *Ann Neurol* **16(3)**:295-304.
418. **Brandner S, Jaunmuktane Z.** 2017. Prion disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathol* **133**:197-222.
419. **Timmes AG, Moore RA, Fischer ER, Priola SA.** 2013. Recombinant prion protein refolded with lipid and RNA has the biochemical hallmarks of a prion but lacks in vivo infectivity. *PLoS One* **8**:e71081.

REFERENCIAS

420. **Gajdusek DC, Gibbs CJ, Jr., Alpers M.** 1967. Transmission and passage of experimental "kuru" to chimpanzees. *Science* **155**:212-214.
421. **Gibbs CJ, Jr., Gajdusek DC.** 1972. Transmission of scrapie to the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Nature* **236**:73-74.
422. **Piening N, Weber P, Giese A, Kretzschmar H.** 2005. Breakage of PrP aggregates is essential for efficient autocatalytic propagation of misfolded prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* **326**:339-343.
423. **Zhang Y, Wang F, Wang X, Zhang Z, Xu Y, Yu G, Yuan C, Ma J.** 2014. Comparison of 2 synthetically generated recombinant prions. *Prion* **8**:215-220.
424. **Makarava N, Ostapchenko VG, Savtchenko R, Baskakov IV.** 2009. Conformational switching within individual amyloid fibrils. *J Biol Chem* **284**:14386-14395.
425. **Jeffrey M, Martin S, Gonzalez L, Foster J, Langeveld JP, van Zijderveld FG, Grassi J, Hunter N.** 2006. Immunohistochemical features of PrP(d) accumulation in natural and experimental goat transmissible spongiform encephalopathies. *J Comp Pathol* **134**:171-181.
426. **Piconi G, Peden AH, Barria MA, Green AJE.** 2019. Epitope mapping of the protease resistant products of RT-QuIC does not allow the discrimination of sCJD subtypes. *PLoS One* **14**:e0218509.
427. **Manca M, Kraus A.** 2020. Defining the Protein Seeds of Neurodegeneration using Real-Time Quaking-Induced Conversion Assays. *Biomolecules* **10**.
428. **Groveman BR, Raymond GJ, Campbell KJ, Race B, Raymond LD, Hughson AG, Orru CD, Kraus A, Phillips K, Caughey B.** 2017. Role of the central lysine cluster and scrapie templating in the transmissibility of synthetic prion protein aggregates. *PLoS Pathog* **13**:e1006623.
429. **Jones EM, Surewicz WK.** 2005. Fibril conformation as the basis of species- and strain-dependent seeding specificity of mammalian prion amyloids. *Cell* **121**:63-72.
430. **Morales R, Abid K, Soto C.** 2007. The prion strain phenomenon: molecular basis and unprecedented features. *Biochim Biophys Acta* **1772**:681-691.
431. **Deleault NR, Kascsak R, Geoghegan JC, Supattapone S.** 2010. Species-dependent differences in cofactor utilization for formation of the protease-resistant prion protein in vitro. *Biochemistry* **49**:3928-3934.
432. **Deleault NR, Walsh DJ, Piro JR, Wang F, Wang X, Ma J, Rees JR, Supattapone S.** 2012. Cofactor molecules maintain infectious conformation and restrict strain properties in purified prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**:E1938-1946.
433. **Fernandez-Borges N, Erana H, Elezgarai SR, Harrathi C, Venegas V, Castilla J.** 2017. A Quick Method to Evaluate the Effect of the Amino Acid Sequence in the Misfolding Proneness of the Prion Protein. *Methods Mol Biol* **1658**:205-216.
434. **Eigen M.** 1971. Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften* **58(10)**:465-523.
435. **Alvarez-Martinez MT, Fontes P, Zomosa-Signoret V, Arnaud JD, Hingant E, Pujo-Menjouet L, Liautard JP.** 2011. Dynamics of polymerization shed light on the mechanisms that lead to multiple amyloid structures of the prion protein. *Biochim Biophys Acta* **1814**:1305-1317.
436. **Xue WF, Homans SW, Radford SE.** 2008. Systematic analysis of nucleation-dependent polymerization reveals new insights into the mechanism of amyloid self-assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:8926-8931.
437. **Pattison IH, Millson GC.** 1961. Further experimental observations on scrapie. *J Comp Pathol* **71**:350-359.
438. **Weissmann C, Li J, Mahal SP, Browning S.** 2011. Prions on the move. *EMBO Rep* **12**:1109-1117.
439. **Burke C, Walsh D, Steele A, Agrimi U, Di Bari MA, Watts JC, Supattapone S.** 2019. Full restoration of specific infectivity and strain properties from pure mammalian prion protein. *PLoS Pathog* **15**:e1007662.

REFERENCIAS

440. **Makarava N, Kovacs GG, Savtchenko R, Alexeeva I, Budka H, Rohwer RG, Baskakov IV.** 2011. Genesis of mammalian prions: from non-infectious amyloid fibrils to a transmissible prion disease. *PLoS Pathog* **7**:e1002419.
441. **Notari S, Capellari S, Giese A, Westner I, Baruzzi A, Ghetti B, Gambetti P, Kretzschmar HA, Parchi P.** 2004. Effects of different experimental conditions on the PrP^{Sc} core generated by protease digestion: implications for strain typing and molecular classification of CJD. *J Biol Chem* **279**:16797-16804.
442. **Moda F, Le TN, Aulic S, Bistaffa E, Campagnani I, Virgilio T, Indaco A, Palamara L, Androletti O, Tagliavini F, Legname G.** 2015. Synthetic prions with novel strain-specified properties. *PLoS Pathog* **11**:e1005354.
443. **Sevillano AM, Aguilar-Calvo P, Kurt TD, Lawrence JA, Soldau K, Nam TH, Schumann T, Pizzo DP, Nystrom S, Choudhury B, Altmepfen H, Esko JD, Glatzel M, Nilsson KPR, Sigurdson CJ.** 2020. Prion protein glycans reduce intracerebral fibril formation and spongiosis in prion disease. *J Clin Invest* **130**:1350-1362.
444. **Raymond GJ, Bossers A, Raymond LD, O'Rourke KI, McHolland LE, Bryant PK, 3rd, Miller MW, Williams ES, Smits M, Caughey B.** 2000. Evidence of a molecular barrier limiting susceptibility of humans, cattle and sheep to chronic wasting disease. *EMBO J* **19**:4425-4430.
445. **Hunter N.** 2003. Scrapie and experimental BSE in sheep. *Br Med Bull* **66**:171-183.
446. **Haley NJ, Siepker C, Walter WD, Thomsen BV, Greenlee JJ, Lehmkuhl AD, Richt JA.** 2016. Antemortem Detection of Chronic Wasting Disease Prions in Nasal Brush Collections and Rectal Biopsy Specimens from White-Tailed Deer by Real-Time Quaking-Induced Conversion. *J Clin Microbiol* **54**:1108-1116.
447. **Gough KC, Maddison BC.** 2010. Prion transmission: prion excretion and occurrence in the environment. *Prion* **4**:275-282.
448. **Knight R.** 1999. The relationship between new variant Creutzfeldt-Jakob disease and bovine spongiform encephalopathy. *Vox Sang* **76**:203-208.
449. **Kyle LM, John TR, Schatzl HM, Lewis RV.** 2013. Introducing a rigid loop structure from deer into mouse prion protein increases its propensity for misfolding in vitro. *PLoS One* **8**:e66715.
450. **Sigurdson CJ, Nilsson KP, Hornemann S, Manco G, Fernandez-Borges N, Schwarz P, Castilla J, Wuthrich K, Aguzzi A.** 2010. A molecular switch controls interspecies prion disease transmission in mice. *J Clin Invest* **120**:2590-2599.
451. **Kurt TD, Sigurdson CJ.** 2016. Cross-species transmission of CWD prions. *Prion* **10**:83-91.
452. **Gorfe AA, Caflich A.** 2007. Ser170 controls the conformational multiplicity of the loop 166-175 in prion proteins: implication for conversion and species barrier. *FASEB J* **21**:3279-3287.
453. **Hagiwara K, Hara H, Hanada K.** 2013. Species-barrier phenomenon in prion transmissibility from a viewpoint of protein science. *J Biochem* **153**:139-145.
454. **Moroncini G, Kanu N, Solfrosi L, Abalos G, Telling GC, Head M, Ironside J, Brockes JP, Burton DR, Williamson RA.** 2004. Motif-grafted antibodies containing the replicative interface of cellular PrP are specific for PrP^{Sc}. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:10404-10409.
455. **Moore RA, Vorberg I, Priola SA.** 2005. Species barriers in prion diseases--brief review. *Arch Virol Suppl*:187-202.