

Estudio de los determinantes moleculares que modulan la resistencia del conejo a la infección por priones utilizando un modelo de propagación *in vitro*

HASIER ERAÑA LASAGABASTER

LEIOA, 2015

Tesis Doctoral:

**Estudio de los determinantes moleculares que
modulan la resistencia del conejo a la
infección por priones utilizando un modelo de
propagación *in vitro***

HASIER ERAÑA LASAGABASTER

LEIOA, 2015

DIRECTORES:

**Dr. Joaquín Castilla Castrillón
Dra. Natalia Fernández-Borges**

TUTOR:

Dr. José Luis Nieva Escandón

SUMMARY

Prion diseases or transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) are a family of rare progressive neurodegenerative disorders distinguished by long incubation periods and characteristic spongiform changes associated with neuronal loss. The causative agent of TSEs is an abnormally folded prion protein (PrP^{Sc}) that is capable to transform the normal cellular prion protein (PrP^C) in new infectious transmissible material. The progressive accumulation of PrP^{Sc} finally leads to brain damage and the characteristic signs and symptoms of these fatal diseases. Since the 60's, TSEs have been described in several mammalian species appearing either naturally (scrapie in sheep, BSE in cattle, CWD in cervids, CJD in human) or by experimental transmission studies (scrapie in mouse or hamster). Prion diseases can be transmitted from one species to another albeit not with the same efficiency in them all. Although many aspects of the prionopathies have been solved in the last 40 years, such as the etiological agent or the fact that prions occur in the form of different strains that show distinct biological and physicochemical properties, there are still many open questions regarding the strain phenomenon and interspecies transmissibility. Apart from transmissibility studies performed by experimental challenges, the BSE outbreak occurred in the UK in the 90's showed that while some species were readily affected (as mice or felines) others did not develop TSE (as rabbits, dogs, horses) even when exposed to the same agent and with PrP sequences very similar to susceptible ones.

Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA) technique mimics the prion replication (PrP^C to PrP^{Sc} conversion) *in vitro* with a similar efficiency to the *in vivo* process but with accelerated kinetics. The recent development of the recombinant-PMCA (rec-PMCA) has permitted to change the source of PrP^C from brains to recombinant protein, allowing a fast, easy and cheap way to study mutations that affect the conversion process, the species barrier or structural characteristics of the PrP^{Sc} among others.

In an attempt to study the mechanisms involved in the high resistance to TSEs of certain species, the mouse-rabbit transmission barrier was used as a model. To study which are the specific aminoacids that determine the susceptibility/resistance to prion propagation, rec-PMCA was used. This new technology allows easy aminoacid substitutions in rabbit PrP and rapid analysis of their misfolding propensity when inoculated with a wide range of prion strains. Since the wild type (wt) rabbit recombinant PrP could not be misfolded by serial rec-PMCA rounds with at least a dozen of prions from a diversity of origins, a series of rabbit recombinant PrP mutants were designed containing every single aminoacid substitution compared to mouse recombinant PrP. At least three promising key substitution have been found that makes rabbit recombinant PrP highly susceptible to misfolding and using these

intermediate mutant misfolded PrPs, misfolded recombinant rabbit PrP was generated. Several studies were done to further characterize the effect and possible mechanisms by which the critical substitutions increased recombinant rabbit PrPs misfolding propensity, but further structural studies on the rabbit PrP mutants detected are required to fully understand the mechanism behind rabbit's resistance to prion disorders.

RESÚMEN

Las enfermedades priónicas o encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs) son un grupo de trastornos neurodegenerativos progresivos que se caracterizan por largos periodos de incubación y por cambios espongiformes característicos asociados a la pérdida neuronal. El agente causante de las EETs es una proteína anormalmente plegada denominada PrP^{Sc} que es capaz de transformar la proteína de prión celular o PrP^C a su isoforma patógena. La acumulación progresiva de PrP^{Sc} conduce a daño cerebral y a la aparición de signos y síntomas característicos de estas enfermedades fatales. Desde los años 60, se han descrito EETs en una gran variedad de especies de mamífero, detectadas en la naturaleza (scrapie en ovejas, EEB en vacas, EDC en cérvidos, ECJ en humanos) o causadas mediante estudios de transmisión experimental (scrapie en ratones o hámsteres). Las enfermedades priónicas pueden transmitirse de una especie a otra aunque no siempre con la misma eficiencia. A pesar de que se han aclarado muchos aspectos acerca de las prionopatías durante los últimos 40 años, como el agente etiológico o el hecho de que los priones aparecen en forma de diferentes cepas que muestran diferentes propiedades biológicas y fisicoquímicas, quedan aún muchas incógnitas en lo que respecta al fenómeno de cepas y a la transmisibilidad interespecífica. Junto con los estudios de transmisibilidad, el brote epidémico de EEB ocurrido en Reino Unido en los años 90, mostró que mientras algunas especies resultaban rápidamente afectadas por la enfermedad (como ratones o felinos), otras no llegaban a desarrollar EETs (como los Conejos, cánidos y caballos), incluso ante la probable exposición al mismo agente infeccioso y a pesar de que las secuencias aminoacídicas de sus PrP son muy similares a las de especies susceptibles.

La técnica de amplificación cíclica de proteínas malplegadas (PMCA) mimetiza la replicación de priones (conversión de PrP^C a PrP^{Sc}) *in vitro* con una eficiencia similar al proceso que ocurre *in vivo*, pero con una cinética acelerada. El reciente desarrollo de la PMCA recombinante (rec-PMCA) ha permitido cambiar el origen de la proteína PrP^C de encéfalos a proteína recombinante de origen bacteriano, lo que permite estudiar de una forma rápida, fácil y económica, entre otras, las mutaciones que pueden afectar al proceso de conversión, la barrera de transmisión o las características estructurales de la PrP^{Sc}.

Con la intención de estudiar los mecanismos implicados en la Resistencia que presentan determinadas especies a las EETs, se ha estudiado la PrP de conejo, utilizando la barrera de transmisión ratón-conejo como modelo. Para determinar qué aminoácidos modulan la susceptibilidad/resistencia a la propagación de priones se decidió utilizar la rec-PMCA. Esta nueva tecnología permite realizar fácilmente sustituciones aminoacídicas a la PrP de conejo y analizar la propensión al malplegamiento de

las PrP mutadas frente a una variedad de cepas priónicas. Como la PrP recombinante de conejo de genotipo salvaje no pudo ser malplegada directamente utilizando rondas seriadas de rec-PMCA y al menos una docena de priones de diversos orígenes, se construyó toda una serie de PrP recombinantes de conejo con cada una de las sustituciones de la PrP murina. Al someterlas a rondas seriadas de rec-PMCA con priones murinos, se identificaron al menos tres sustituciones prometedoras que hacían que las PrP recombinantes de conejo mutadas fueran susceptibles a la propagación de priones murinos. Y estos mismos mutantes intermedios utilizados como semilla de rec-PMCA fueron capaces de inducir el malplegamiento de la PrP recombinante de conejo salvaje. Se realizaron además diversos estudios para la caracterización del efecto de estas sustituciones y para aclarar posibles mecanismos por los que incrementan la propensión al malplegamiento de la PrP recombinante de conejo. No obstante, se requerirán estudios estructurales más detallados de las PrP mutadas detectadas para entender completamente el mecanismo molecular que se esconde tras la Resistencia de los Conejos a las enfermedades priónicas.

ABREVIATURAS/GLOSARIO

- μg : microgramo
- μl : microlitro
- μm : micrómetro
- $^{\circ}\text{C}$: grado centígrado
- 12B2: anticuerpo monoclonal anti-PrP denominado 12B2

A

- ARN: ácido ribonucleico
- ARNm: ácido ribonucleico mensajero
- A β : péptido beta amiloide
- AFM: microscopía electrónica de fuerza atómica, del inglés, *atomic force microscopy*
- ADN: ácido desoxirribonucleico

B

- BiP: del inglés, *binding immunoglobulin protein*
- BSE: del inglés, *bovine spongiform encephalopathy*

C

- C-ter: extremo carboxilo terminal de una proteína
- CB: del inglés, *Conversion Buffer*
- CC: del inglés, *charged cluster*
- CD: del inglés, *Circular Dichroism*
- CWD: del inglés, *chronic wasting disease*
- CPEB: del inglés, *cytoplasmic polyadenylation element binding protein*
- CHO: glicosilación
- CMV: citomegalovirus

D

- Da: dalton
- DNAsa: deoxirribonucleasa
- dNTP: del inglés, *deoxynucleotide triphosphates*
- DO₆₀₀: densidad óptica a 600nm
- DY: *Drowsy*, cepa de prión de hámster

E

- *E. coli*: *Escherichia coli*

- ECJ: enfermedad de Creutzfeldt-Jakob
- EDC: enfermedad debilitante crónica en ciervos
- EDTA: etilendiaminotetraacético
- EEB: encefalopatía espongiforme bovina
- EEF: encefalopatía espongiforme felina
- EET: encefalopatía espongiforme transmisible
- EtBr: bromuro de etidio
- ETV: encefalopatía transmisible de visión
- EUE: encefalopatía espongiforme de ungulados exóticos
- EPR: resonancia paramagnética electrónica, del inglés, *electron paramagnetic resonance*
- eIF2 α : del inglés, *eukaryotic translation initiation factor 2 alpha*

F

- F: del inglés, *forward*
- FTIR: del inglés, *fourier transform infrared spectroscopy*
- FPLC: del inglés, *Fast Protein Liquid Chromatography*

G

- *g*: fuerza centrífuga relativa
- GPI : del inglés, *glycosylphosphatidylinositol*
- GSS: Gerstmann-Sträussler-Scheinker
- GFAP: proteína ácida fibrilar glial, del inglés, *Glial Fibrillary Acidic Protein*
- GndCl: hidrocloreuro de guanidinio

H

- h: hora
- HC: del inglés, *hydrofobic core*
- HY: *Hyper*, cepa de prión de hámster
- HET-s: proteína fúngica que regula la incompatibilidad del heterocarión

I

- IFF: insomnio fatal familiar
- IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiraósido

K

- kDa: kilodalton
- kg: kilogramo

- kV: kilovoltio

L

- LB: Luria Bertoni, medio de cultivo de bacterias
- LD50: dosis letal para el 50%, del inglés, *lethal dose 50%*

M

- M: molar
- mA: mili amperios
- mg: miligramo
- min: minuto
- ml: mililitro
- mm: milímetro
- mM: milimolar
- MAVS: del inglés, *mitochondrial antiviral signaling*
- MS: espectrometría de masas, del inglés, *mass-spectrometry*
- ME: microscopía electrónica
- ME7: cepa de prion ovino adaptado a ratón

N

- N-ter: extremo amino terminal de una proteína
- ng: nanogramo
- nm: nanómetro
- Nor98: cepa de prion ovino atípica
- N2a: línea celular de neuroblastoma de ratón
- ND: no descrito
- NA: no amplificado

O

- ORF: marco de lectura abierto, del inglés, *open reading frame*
- OR: octa repeticiones, del inglés, *octapeptide repeats*

P

- p/v: peso/volumen
- PBS: del inglés, *phosphate buffered saline*
- PCR: del inglés, *polymerase chain reaction*
- PK: proteinasa K

- PMCA: del inglés, *protein misfolding cyclic amplification*
- PMCAa: PMCA automatizada
- PERK: del inglés, *protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*
- PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- *PRNP*: gen que codifica la proteína PrP
- *PRNP*^{-/-}: animal transgénico *knock out* para el gen que codifica la proteína PrP
- *PRNP*^{+/-}: animal transgénico hemicígote para el gen que codifica la proteína PrP
- PrP: proteína del prion, del inglés, *Prion protein*
- PrP*: PrP en un estado conformacional transitorio, intermedio entre PrP^C y PrP^{Sc}
- PrP₂₃₋₂₃₁: PrP recombinante, compuesta por los aminoácidos 23-231
- PrP²⁷⁻³⁰: PrP resistente a PK de 27-30 kDa
- PrP^C: isoforma celular de PrP, del inglés, *cellular prion protein*
- PrP^{res}: PrP resistente a la digestión con PK
- PrP^{Sc}: isoforma patógena de PrP, del inglés, *Scrapie associated Prion Protein*
- PrP^{Sc-PMCA}: isoforma patógena de PrP generada *in vitro* mediante PMCA
- PTA: del inglés, *sodium phosphotungstic acid*
- PVDF: polifluoruro de vinilideno

Q

- QUIC: del inglés, *quaking induced conversion*

R

- R: del inglés, *reverse*
- rec-PrP: PrP recombinante
- rec-PMCA: PMCA realizada con sustrato basado en PrP recombinante
- RML: cepa de prion ovino adaptado a ratón en el *Rocky Mountain Laboratory*
- rpm: revoluciones por minuto
- RE: retículo endoplásmico
- RMN: resonancia magnética nuclear
- RK13: línea celular del epitelio renal de conejo, del inglés, *rabbit kidney 13*

S

- s: segundo
- Saf83: anticuerpo monoclonal anti-prion Saf83
- Saf84: anticuerpo monoclonal anti-prion Saf84

- SNC: sistema nervioso central
- Sinc: del inglés, *scrapie incubation*
- SIP: del inglés, *shorter incubation period*
- Sup35: gen de levadura que codifica un factor terminador de transcripción
- S-S: puente disulfuro
- SDS-PAGE: del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

T

- Tris-HCl: tris(hidroximetil)aminometano hidrocloreuro
- TME: del inglés, *transmissible mink encephalopathy*
- TEM: microscopía electrónica de transmisión, del inglés, *transmission electron microscopy*
- ThT: del inglés, *thioflavine T*

U

- Ure2: gen de levadura que codifica un transportador de ureidosuccinato
- UPR: del inglés, *unfolded protein response*

V

- v/v: volumen/volumen
- vECJ: variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob
- VPSPr: del inglés, *variably protease-sensitive prionopathy*

W

- WB: del inglés, *Western blot*
- wt: del inglés, *wild-type*

Tabla de los 20 aminoácidos junto con su abreviatura y código

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

ÍNDICE

SUMMARY	2
REÚMEN	4
ABREVIATURAS/GLOSARIO	6
ÍNDICE	11
INTRODUCCIÓN	15
1. Encefalopatías Espongiformes Transmisibles y su agente causal	16
1.1. Inicios de la investigación en Encefalopatías Espongiformes Transmisibles.....	18
1.2. Hacia la determinación de la naturaleza del agente infeccioso	20
1.3. Descripción de nuevas EETs en animales.....	20
1.4. Formulación de la hipótesis de “sólo proteína”	22
1.5. Aparición de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB)	25
1.6. La bioquímica y la biología molecular moderna respaldan la hipótesis de “sólo proteína”	27
1.7. Nuevos modelos animales respaldan la hipótesis de “sólo proteína”	28
1.8. Nuevos modelos <i>in vitro</i> respaldan la hipótesis de “sólo proteína”	30
1.9. Hacia el fin de la controversia sobre la naturaleza del agente infeccioso	31
2. PrP^C, PrP^{Sc} y el mecanismo de conversión	32
2.1. PrP ^C	37
2.2. Mecanismo de conversión a PrP ^{Sc}	41
2.3. PrP ^{Sc}	47
2.3.1. Neurotoxicidad	49
2.3.2. Rutas de adquisición y dispersión	52
2.3.3. Fenómeno de cepas.....	54
3. Barrera de transmisión	59
3.1. Especies resistentes a enfermedades priónicas	61
3.1.1. La PrP de conejo.....	64
4. Sistemas de propagación <i>in vitro</i> de priones	64
4.1. Ensayo de conversión libre de células	64

4.2.	Amplificación cíclica de proteínas malplegadas (PMCA)	67
4.2.1.	El uso de PrP recombinantes en PMCA	67
4.3.	Conversión Inducida por Agitación (QUIC, <i>QUaking Induced Conversion</i>)	68
OBJETIVOS		69
MATERIALES Y MÉTODOS		70
1.	Construcción de los plásmidos de expresión de las PrP de conejo, ratón y hámster sirio	70
2.	Construcción de los plásmidos de expresión de la PrP de conejo con sustituciones de la PrP de ratón	72
2.1.	Selección de las mutaciones.....	72
2.2.	Diseño de oligonucleótidos	73
2.3.	Mutagénesis dirigida secuencial en dos pasos.....	74
2.4.	Clonación de los genes que codifican las PrPs ₂₃₋₂₃₁ de conejo mutadas en el vector de expresión de proteínas pOPIN E	76
3.	Construcción de los plásmidos de expresión de las PrPs de conejo mutadas más susceptibles a RML con sustituciones alternativas a las de la PrP de ratón	77
3.1.	Selección de las mutaciones.....	77
3.2.	Diseño de oligonucleótidos	79
3.3.	Mutagénesis dirigida secuencial en dos pasos.....	79
3.4.	Clonación de los genes que codifican las PrPs ₂₃₋₂₃₁ de conejo con mutaciones alternativas en el vector de expresión de proteínas pOPIN E.....	80
4.	Construcción de los plásmidos de expresión de las PrPs de ratón con sustituciones de la PrP de conejo	81
4.1.	Selección de las mutaciones.....	81
4.2.	Diseño de oligonucleótidos	82
4.3.	Mutagénesis dirigida secuencial en dos pasos.....	83
4.4.	Clonación de los genes que codifican las PrPs ₂₃₋₂₃₁ de ratón con sustituciones de la PrP de conejo en el vector de expresión de proteínas pOPIN E	84
5.	Construcción de los plásmidos de expresión de las PrPs de conejo con sustituciones múltiples de la PrP de ratón	85
5.1.	Selección de las mutaciones.....	85
5.2.	Diseño de oligonucleótidos	85
5.3.	Mutagénesis dirigida secuencial en dos pasos.....	86

5.4.	Clonación de los genes que codifican las PrP _{S23-231} de conejo con múltiples mutaciones en el vector de expresión de proteínas pOPIN E	87
6.	Generación de las proteínas PrP recombinantes	88
6.1.	Transformación de plásmidos en bacterias mediante choque térmico	88
6.2.	Expresión y purificación de las proteínas PrP recombinantes	89
6.2.1.	Purificación de las PrPs recombinantes mediante columnas de afinidad de histidinas	90
6.2.2.	Post-purificación de las PrP recombinantes mediante gel filtración acoplado a un sistema de FPLC	90
7.	Preparación de sustratos para PMCA	91
7.1.	Sustratos basados en homogeneizados completos de encéfalo	92
7.2.	Sustratos basados en PrP recombinante complementada con homogeneizado de encéfalo	92
8.	Cepas de priones	93
9.	Propagación <i>in vitro</i> de priones mediante PMCA	94
10.	Estudios bioquímicos de los priones	96
10.1.	Estudio de resistencia de los priones a la digestión con proteinasa K (PK)	96
10.2.	Detección de proteínas mediante la técnica de <i>Western blot</i> (WB)	96
10.3.	Cuantificación de bandas inmunoreactivas de PrP ^{res}	97
11.	Análisis comparativo de la propensión a adquirir conformación estado-β de las PrP recombinantes frente al tratamiento con agentes caotrópicos seguido por Dicroísmo circular	97
RESULTADOS		100
1.	Malplegamiento sin éxito de la proteína priónica recombinante de conejo <i>in vitro</i> mediante inoculación con cepas de diversa procedencia	100
2.	Generación de PrP recombinantes de conejo con sustituciones específicas de la PrP de ratón	103
3.	Malplegamiento <i>in vitro</i> de las PrP mutantes recombinantes de conejo	106
3.1.	Malplegamiento inducido mediante RML recombinante	107
3.2.	Malplegamiento inducido mediante RML procedente de encéfalo de ratón afectado	110
3.3.	Evaluación de la capacidad de propagación en sus propios sustratos	114

4. Superación de la barrera de transmisión entre conejo y ratón mediante las PrP ^{res} recombinantes de conejo con sustituciones de ratón	118
5. Análisis de las características bioquímicas de los inóculos generados mediante ensayo de resistencia a Proteinasa K	123
6. Estudio de la capacidad de propagación de PrP recombinantes de conejo con múltiples mutaciones de ratón	125
7. Refinando el papel de las sustituciones que más susceptible hacen la PrP recombinante de conejo al malplegamiento por RML	128
8. Estudio de la capacidad de las PrP recombinantes de ratón con mutaciones de conejo de bloquear la propagación del prion murino RML recombinante.....	132
9. Estudio de la capacidad de propagación de otros inóculos en sustratos basados en las PrP recombinantes mutadas de conejo más susceptibles a RML.....	136
10. Análisis comparativo de la propensión a adquirir conformación estado- β de las PrP recombinantes de ratón, conejo y conejo I202V frente al tratamiento con agentes caotrópicos seguido por Dicroísmo circular	138
DISCUSIÓN.....	144
CONCLUSIONES.....	179
BIBLIOGRAFÍA	181

INTRODUCCIÓN

1. Encefalopatías Espongiformes Transmisibles y su agente causal

Las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs), también conocidas como enfermedades priónicas o prionopatías, son un grupo de enfermedades neurodegenerativas fatales y transmisibles que afectan a una gran variedad de mamíferos incluidos los seres humanos. Entre las enfermedades priónicas más conocidas están el Kuru, la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ), el Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) y el Insomnio Familiar Fatal (IFF) que afectan a seres humanos; la tembladera o scrapie que aparece en ovejas, cabras y muflones; la Encefalopatía Transmisible del Visón que se ha observado en visones en cautividad; la Enfermedad Debilitante Crónica (EDC) que afecta a diversas especies de cérvidos salvajes y en cautividad; la Encefalopatía Espongiforme Felina (EEF) observada en gatos domésticos; y la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB), más conocida como “Enfermedad de las vacas locas” causante de la epidemia que afectó a miles de bóvidos del Reino Unido y otros países entre los años 1980 y 1990.

Los individuos que padecen esta devastadora enfermedad neurodegenerativa presentan disfunción motora y cognitiva progresiva así como ataxia cerebral entre los signos clínicos más característicos. El estudio postmortem de sus encéfalos muestra degeneración espongiforme, astrogliosis y acumulación de agregados de proteína malplegada (Figura 1), observaciones imprescindibles para el diagnóstico definitivo de la enfermedad (Budka, Aguzzi et al. 1995). A pesar de las características comunes mencionadas, el tiempo de incubación y la patología varían considerablemente entre las distintas enfermedades priónicas, lo que junto con su particular transmisibilidad llevó inicialmente a creer que estas enfermedades podrían ser causadas por un virus lento. Sin embargo, la ausencia de evidencias que apoyaran que el agente causal de la enfermedad fuese un virus, llevó a la controvertida propuesta de que la enfermedad pudiese estar causada por un inusual agente de naturaleza proteica (Cobb and Surewicz 2009).

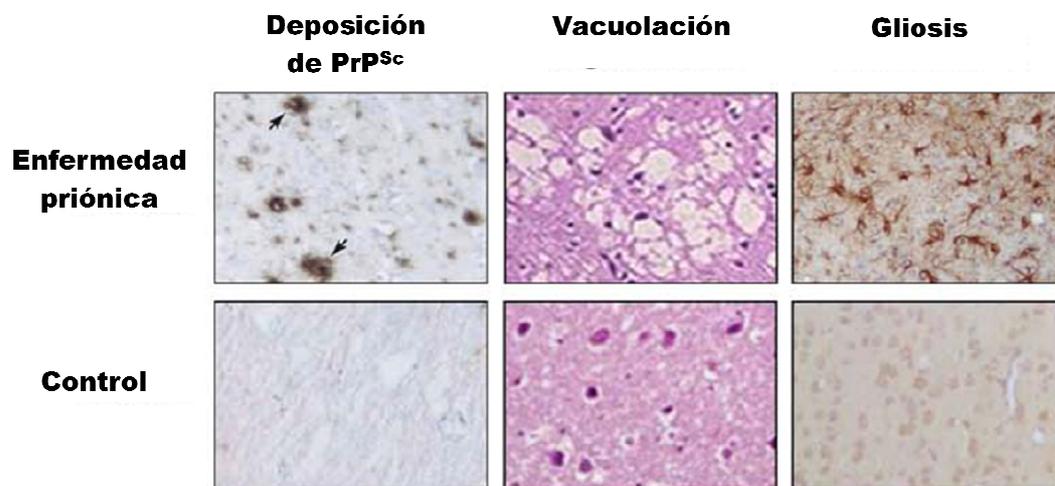


Figura 1. Anomalías que muestran los encéfalos de individuos afectados por enfermedades priónicas. Deposición de PrP^{Sc} (del inglés, *Scrapie associated Prion Protein*) visualizada por inmunohistoquímica con anticuerpos anti-PrP (del inglés, *Prion Protein*). Vacuolación o degeneración espongiiforme observada tras la tinción con hematoxilina-eosina. Astrogliosis, como marcador de inflamación en el encéfalo, observada por tinción inmunohistoquímica con anticuerpos anti-GFAP (del inglés, *Glial Fibrillary Acidic Protein*), específica para astrocitos reactivos (Adaptado de (Soto and Satani 2011)).

1.1. Inicios de la investigación en Encefalopatías Espongiformes Transmisibles

La dificultad para determinar el agente causante así como su naturaleza única y hasta hace poco desconocida, ha propiciado un intenso debate que perdura desde su descripción inicial. La primera mención documentada de una enfermedad priónica data del año 1732 en una petición de los pastores del área de Lincolnshire al Parlamento de Inglaterra. En él se demandaba mayor regulación en la importación de ovejas debido a la enfermedad que presentaba una oveja de raza merina de origen español, causante de un brote de tembladera o scrapie en el área. Desde entonces, fueron sucediéndose periódicamente informes de carácter más científico como por ejemplo, en el seno de la *Agricultural Society of Bath* en 1788 o en la *General View of Agriculture of Wiltshire* donde en 1811, Thomas Davies describía en un breve párrafo los signos que presentaban las ovejas con scrapie y lo relacionaba con los diversos brotes que se venían documentando desde el acaecido en Lincolnshire, 80 años antes. Ya en el siglo XIX empezaron a postularse diferentes teorías entorno a la causa de la enfermedad, como la sugerida por Roche-Lubin en 1848 en que se atribuía la tembladera a la sobreactividad sexual en los rebaños o a las tormentas eléctricas, la propuesta por Besnoit en 1899 que apuntaba hacia una enfermedad viral causada por un “agente filtrable”, o la postulada por M’Gowan que asociaba la

enfermedad al parásito *Sarcosporidium* a comienzos del siglo XX (Liberski 2012). En el año 1936, la transmisibilidad de la tembladera fue demostrada por primera vez experimentalmente a través de la inoculación intraocular en ovejas sanas de médula espinal procedente de una oveja infectada, que además de reavivar el interés por la enfermedad permitió constatar el largo periodo de incubación necesario para la presentación de signos clínicos (Cuille and Chelle 1936). El estudio anterior, junto con su confirmación por William Gordon en el Instituto Moredun de Edimburgo y la evidencia de que se trataba de un agente filtrable, parecían señalar hacia un agente vírico. Aunque ciertos detalles como la ausencia de inactivación del patógeno por acción de la formalina derivada del estudio de Gordon, donde se utilizaron encéfalos de animales infectados fijados en formalina como inóculo, seguían haciendo patente las peculiares características del misterioso agente causal (Liberski 2012).

También a principios del siglo XX, aunque sin relación alguna aún con la tembladera de las ovejas, se documentaron las primeras enfermedades priónicas en seres humanos. Varios casos de una nueva enfermedad neurológica compleja, de evolución rápida y que no parecían atribuibles a ninguna entidad conocida, fueron descritos y publicados entre 1920 y 1923 por los neurólogos alemanes Hans Gerhard Creutzfeldt y Adolf Jakob ((Creutzfeldt 1920), (Jakob 1921)). Aunque posteriormente sólo algunos de ellos demostraron ser realmente casos de EETs, esta primera enfermedad priónica humana, recibió y conserva a día de hoy la denominación de Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob. A partir de estas primeras descripciones, fueron apareciendo otros casos de enfermedades neurodegenerativas similares que en muchos casos se incluyeron equivocadamente en el grupo como ECJ o que al contrario se publicaron bajo otras denominaciones como encefalomielopatía diseminada, pseudoesclerosis espástica, degeneración cortico-pálido-espinal, degeneración cortico-estriato-espinal o síndrome de Jakob, encefalopatía vascular subaguda, encefalopatía subaguda progresiva, atrofia presenil esponjosa subaguda etc. reflejo de la confusión, controversia y dificultades nosológicas que presentaban el heterogéneo grupo de casos descritos. Cabe destacar de esta época, la descripción en 1936 de una familia con varios miembros fallecidos con demencia progresiva y ataxia cerebelosa por parte de Gerstmann, Sträussler y Scheinker, que décadas más tarde sería incluida en el grupo de enfermedades priónicas humanas como un síndrome diferenciado de la ECJ (Liberski 2012).

Sin embargo, uno de los avances más significativos en el camino hacia la definición de las EETs no llegaría hasta finales de la década de los 50, desde el otro extremo del mundo con la descripción del Kuru, enfermedad endémica de los fore de Papúa, Nueva Guinea, cuya descripción inicial realizada por Vincent Zigas, oficial médico de la región, lo calificaba como “un nuevo tipo de encefalitis”. Esto atrajo al

lugar al Dr. Carleton Gajdusek, clave en la posterior definición de las enfermedades priónicas y galardonado por ello con el Premio Nobel de Medicina en 1976. A pesar de creer primero que se trataba de una enfermedad genética, pronto establecieron la teoría de un origen infeccioso, proponiendo las prácticas rituales caníbales de la tribu como vehículo de transmisión (Liberski 2012). A partir de las muestras y descripciones de Gajdusek en individuos afectados por Kuru, fue en realidad Igor Klatzo quien en 1957 ofreció la primera pista que lo relacionaría con la ECJ, indicando que era la enfermedad descrita más parecida al Kuru en que podía pensar y descartando su posible origen genético (Klatzo, Gajdusek et al. 1959). Aún así, a pesar de todos los esfuerzos realizados por Gajdusek y sus colaboradores, no pudieron aislar el patógeno que en aquel momento se creía mayoritariamente un virus lento, ni fueron capaces de transmitir la enfermedad a animales de experimentación (Liberski 2012). Sin embargo, al cabo de un par de años y gracias a las observaciones del patólogo veterinario William Hadlow, la situación cambió drásticamente al señalar éste que las lesiones observadas en encéfalos de afectados por Kuru eran asombrosamente similares a las que se observaban en animales afectados por scrapie. Además, sugirió probar la naturaleza transmisible del Kuru mediante transmisión experimental a primates, dada la transmisibilidad del scrapie entre ovejas (Hadlow 1959). Estas observaciones publicadas en Lancet, impulsaron a Gajdusek y Gibbs a demostrar con éxito la transmisión experimental del Kuru a chimpancés en 1966 (Gajdusek, Gibbs et al. 1967) debido a la conexión sugerida por Klatzo, de la ECJ en 1968 (Gibbs, Gajdusek et al. 1968). A pesar de la relevancia de la demostración de la transmisibilidad de estas enfermedades que afectan a seres humanos y otras que les siguieron como la del GSS y el IFF y su agrupación bajo el concepto de demencias transmisibles, la naturaleza del agente infeccioso aún estaba sin esclarecer. Cabe destacar también, en el contexto de las enfermedades priónicas humanas, el descubrimiento accidental de la transmisión iatrogénica de la ECJ, mediante un caso publicado en 1974 en que se describía el caso de una mujer fallecida por ECJ dos años después de un implante de córnea de un donante en quien pudo confirmarse la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (Duffy, Wolf et al. 1974).

1.2. Hacia la determinación de la naturaleza del agente infeccioso

Prácticamente en paralelo a todo lo relacionado con las enfermedades en humanos, la investigación en el campo del scrapie también trataba de determinar al esquivo agente causante de la enfermedad. Tras los descubrimientos de Gordon y a pesar de que la II Guerra Mundial ralentizó la investigación en el campo, siguió prevaleciendo la idea postulada por Sigurdsson en 1954 de que la enfermedad era una “infección causada por un virus lento”. Sin embargo, poco más tarde, quedó patente una vez más la

naturaleza atípica del supuesto patógeno por su extraordinaria resistencia a agentes fisicoquímicos, que normalmente inactivan virus, demostrado esta vez por Pattison y colaboradores (Pattison 1965). La aportación fundamental de estos mismos investigadores fue demostrar por un lado, que el scrapie podía ser transmitido a cabras y que distintas razas de oveja presentaban diferente susceptibilidad al scrapie, estableciendo así el concepto de barrera interespecífica de transmisión; y por otro lado, describir la existencia de diferentes cepas de priones por primera vez, dado que cabras infectadas con el mismo aislado de scrapie presentaban diferencias en la manifestación de la enfermedad: distintos periodos de incubación, signos clínicos y perfil de lesiones (revisado en (Solforosi, Milani et al. 2013)). Aunque ambos conceptos se desarrollarán con más detalle en apartados posteriores de esta introducción, cabe destacar aquí que la existencia de cepas supuso un respaldo importante a la propuesta de que la enfermedad estaba causada por algún tipo de virus lento, achacándose las diferencias entre cepas a diferencias en la información genética del agente causal del scrapie.

El siguiente gran avance en el campo de las EETs ocurrió también durante la década de los 60 con la transmisión del scrapie de cabras a ratones realizado por Chandler y de ovejas a ratones llevado a cabo por Morris y Gajdusek. Este experimento permitió por primera vez la realización de estudios a gran escala y demostró además que la transmisibilidad interespecies era posible también en especies taxonómicamente más alejadas que las vistas hasta el momento. A pesar del impulso que esto supuso en el área y que se refleja en la gran cantidad de teorías surgidas en la época en relación a la identidad del agente infeccioso: viroide, elemento tipo retrovirus o membrana con capacidad autoreplicativa, ninguna de ellas pudo ser probada (revisado en (Liberski 2012)). No obstante, la disposición de ratones como modelo experimental de la enfermedad permitió dar un notable impulso al estudio detallado del agente patogénico y su controvertida clasificación inicial como virus lento fue perdiendo adeptos a medida que se sucedían las evidencias en contra. En este sentido, además de la imposibilidad de aislar partícula vírica alguna y la ausencia de respuesta inmune en individuos afectados, destacan los estudios realizados por Tikvah Alper y colaboradores que evidenciaron la inusual resistencia del patógeno frente a tratamientos por radiación ultravioleta o por nucleasas en dosis mayores a las utilizadas habitualmente para la inactivación de ácidos nucleicos. Por otro lado se estimó un tamaño de unos 2×10^5 Dalton (Da), demasiado pequeño para tratarse de un virus o cualquier otro microorganismo conocido (Alper 1972). Esto reavivó la controversia acerca del agente infeccioso, ya que un nutrido grupo de investigadores se mostraba reacio a aceptar que una entidad pudiese, según Alper, “multiplicarse en el nuevo huésped sin que su estructura estuviese asociada a ningún ácido nucleico”. La sugerencia de que por tanto, debía tratarse de otro tipo de entidad capaz de aumentar su cantidad sin

acarrear en sí mismo ningún ácido nucleico, condujo a Griffith a sugerir que el agente infeccioso podría ser una proteína y a teorizar sobre las posibles formas que podría tener de replicarse en el contexto de la biología molecular conocida (Griffith 1967).

1.3. Descripción de nuevas EETs en animales

Entre las décadas de los 50 y los 80 se describió la enfermedad en especies en las cuales no se había observado antes. Es el caso de la Encefalopatía Transmisible del Visón (ETV, del inglés *Transmissible Mink Encephalopathy*, TME), descrita por primera vez en una granja de cría de visones en EEUU en 1947 aunque no se reportaron más brotes hasta 1960 en el mismo país. El origen de estos y otros brotes ocurridos en la época en Canadá, Europa Occidental y en Repúblicas de la antigua Unión Soviética nunca ha podido confirmarse aunque las evidencias parecen señalar que la fuente podría ser el alimento contaminado con proteínas animales, como en el último brote descrito en 1985 en Wisconsin, donde se trazó el posible origen a alimento con proteínas de vaca y caballo (Marsh and Hadlow 1992). Así mismo, el primer caso de Enfermedad Debilitante Crónica (EDC o del inglés *Chronic Wasting Disease*, CWD) data de 1967 y se diagnosticó en un ejemplar de ciervo mula (*Odocoileus hemionus*) en cautividad en Colorado. La enfermedad que desde entonces se ha vuelto endémica en buena parte de Norteamérica, se caracteriza por una pérdida de peso crónica que lleva inevitablemente a la muerte y que afecta a diversas especies de ungulados tanto domésticos como salvajes. A pesar de que no se ha observado por el momento transmisión a otros animales o a seres humanos, la dimensión epidémica que ha alcanzado la enfermedad en cérvidos de Norteamérica y la exitosa transmisión experimental realizada a monos ardilla o saimirí (*Saimiri sciureus*) exigen una intensiva vigilancia sobre las poblaciones de cérvidos salvajes y cautivos de las regiones afectadas.

1.4. Formulación de la hipótesis de “sólo proteína”

Volviendo a la naturaleza del agente infeccioso causante del scrapie, la década de los 80 supuso un antes y un después gracias a la aportación de Stanley Prusiner, galardonado en 1997 con el Premio Nobel de Medicina por su trabajo en este campo. Basándose en los estudios teóricos de Griffith y en las propiedades que distinguían el agente causal del scrapie de los virus, plásmidos y viroides, propuso el término prion (del inglés *Proteinaceous Infectious Particle*) para denominar a la pequeña partícula infecciosa, sensible a proteasas y agentes alcalinos pero resistente a diversos procedimientos para la inactivación específica de ácidos nucleicos, y que por tanto, requeriría de un componente proteico para la infectividad (Prusiner 1982). También a principios de esa misma década, se tuvo la primera evidencia

morfológica del posible agente causal; concretamente, Patricia Merz y colaboradores fueron los primeros en ver estructuras fibrilares anormales, como las que se muestran en la figura 2, en encéfalos de animales y seres humanos afectados por scrapie, ECJ y Kuru por tinción negativa en microscopía electrónica aunque los calificaran erróneamente como “virus filamentosos” (Merz, Somerville et al. 1981). Prácticamente de forma simultánea, Prusiner y colaboradores visualizaron las mismas estructuras a las que denominaron como “varillas de prion” proponiendo que podría tratarse de un amiloide y poco más tarde, consiguieron aislar la proteína del prion (PrP) a partir de homogenizados de encéfalos infectados.

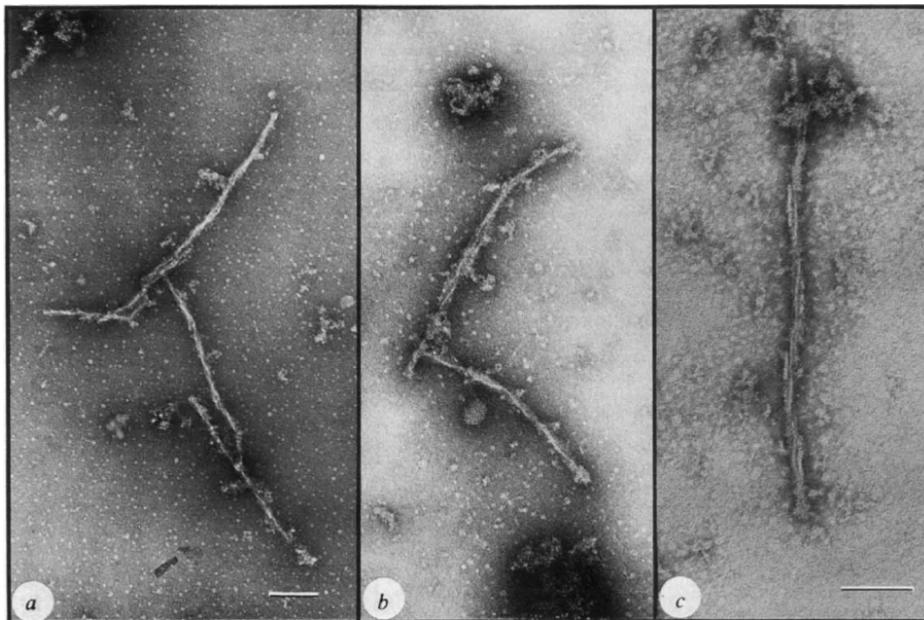


Figura 2. Imágenes de microscopía electrónica de las fibras asociadas a enfermedad priónica obtenidas por Mertz y colaboradores. A) Muestra proveniente de encéfalo de hámster inoculado con homogenizado de encéfalo de un paciente de ECJ. Amplificado x86000 B) Muestra proveniente de encéfalo de paciente humano con ECJ. Amplificado x133000. C) Muestra proveniente de encéfalo de oveja afectada por scrapie. Amplificado x133000. Todas teñidas con PTA (del inglés, *sodium phosphotungstic acid*). Barras de escala de 0,1 μm (De (Merz, Somerville et al. 1983)).

Esta proteína, resistente a proteasas y de un tamaño aproximado de 27-30 kDa que se denominó PrP²⁷⁻³⁰, fue vinculada a la infectividad dado que era el componente principal de aquellas fracciones capaces de transmitir la enfermedad. Además, se observó que se acumulaba en los encéfalos de los individuos afectados organizándose en muchos casos como depósitos amiloideos (Bolton, McKinley et al. 1982). El aislamiento y la obtención de la secuencia de la parte amino terminal de la PrP por parte del grupo de Prusiner, permitió a Oesch y colaboradores demostrar que dicha proteína estaba codificada en

un gen de copia única y que provenía de una proteína mayor, de unos 33-35 kDa (Oesch, Westaway et al. 1985). Finalmente, todo esto llevó al grupo de Charles Weissmann a la identificación y clonaje del gen que codifica la PrP en el año 1986, demostrando también que el ARN mensajero (ARNm) que codifica la PrP era efectivamente, el producto de un gen de copia única (*PRNP*) que se expresa de forma constitutiva en el encéfalo de animales sanos, así como en distintos tipos celulares. Así mismo, estos estudios determinaron que la PrP²⁷⁻³⁰, también denominada PrP^{Sc} (isoforma PrP scrapie, por su asociación con la enfermedad) y la PrP descubierta en animales sanos, llamada PrP^C (isoforma PrP celular, no asociada a la enfermedad) estaban codificadas en el mismo gen cromosómico (Basler, Oesch et al. 1986).

Todos estos descubrimientos culminaron en lo que se conoce como la hipótesis de “sólo proteína”, en la que se propone que la PrP^{Sc}, forma anormalmente conformada de la PrP^C, es el único componente del agente infeccioso de las enfermedades priónicas cuya propagación no está vinculada a ningún ácido nucleico específico. Además, establecieron las bases para la increíble expansión del área de las enfermedades priónicas que sobrevendría durante las siguientes tres décadas. De todas formas, diversas cuestiones planteadas antes de los 80, junto con la naturaleza del agente infeccioso siguen siendo controvertidas a pesar de que la gran mayoría de la comunidad científica ha llegado a aceptar la teoría de Prusiner, respaldada por algunos indicios que se han demostrado posteriormente y que se describirán más adelante en este mismo apartado.

1.5. Aparición de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB)

La década de los 80 marcó también otro hito en el campo debido a la aparición de la enfermedad priónica con mayor repercusión social, epidemiológica y económica conocida hasta el momento, la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB), conocida popularmente como el mal de las vacas locas. Descrita por primera vez en 1985 en una granja del sur de Inglaterra en una vaca frisona adulta, para febrero de 1986 ya eran 9 vacas del mismo rebaño que presentaban los mismos signos clínicos que la primera. El análisis histopatológico del cerebro de estos animales mostró una gran similitud con los afectados por scrapie (Pattison 1998). Muy poco después de la identificación de la EEB, estudios epidemiológicos indicaron que la infección provenía de la alimentación del ganado bovino con harinas cárnicas preparadas a partir de animales infectados. Lo que llevó rápidamente, en Julio de 1988 a la prohibición del uso de harinas cárnicas provenientes de rumiantes para alimentar rumiantes. A pesar de ello, debido al tiempo medio de incubación de la enfermedad de unos 5 años, los efectos de dicha prohibición no empezaron a surtir efecto hasta 1993, momento en que empezaron a reducirse los casos

diagnosticados por año. Esta prohibición fue seguida de otra preventiva que en 1989 prohibía la inclusión de tejidos de ganado bovino con alta carga del agente causal, que se determinaron en función de los estudios de transmisibilidad realizados con el scrapie, en la cadena de alimentación humana, con la intención de proteger la salud pública. La importancia económica de la EEB se refleja además en la incidencia de la enfermedad en ganado bovino que se muestra en la figura 3, puesto que desde 1985 hasta el 2006 se han contabilizado unos 180.000 casos en Reino Unido, 44.000 de ellos nacidos tras la prohibición de 1998 y cuyo origen se achaca a contaminaciones del alimento de rumiantes con el del ganado porcino o aviar, en los que no se prohibieron las harinas cárnicas hasta 1996 (Bradley, Collee et al. 2006). La repercusión social derivada de la EEB que dio gran visibilidad a las enfermedades priónicas como consecuencia de su potencial zoonótico, llegó unos pocos años más tarde, alrededor de 1995 cuando se diagnosticó el primer caso de ECJ en un adolescente británico. Al cabo de un año, cuatro jóvenes más enfermaron mostrando una ECJ con una manifestación atípica. La juventud de los afectados, un periodo más largo de la fase clínica y diferencias histopatológicas significativas discrepaban de la ECJ clásica (Pattison 1998). De ahí que esta nueva versión de ECJ se denominara originalmente como la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vECJ). La incidencia de esta nueva patología siguió creciendo en Reino Unido hasta alcanzar su máximo en el año 2000 con más de 25 casos diagnosticados ese año tal y como muestra la figura 3 (Bradley, Collee et al. 2006). El análisis bioquímico realizado por John Collinge y colaboradores de la PrP^{Sc} presente en los individuos afectados por vECJ demostró que el patrón era claramente distinguible de la ECJ clásica y en cambio muy similar al patrón bioquímico de la PrP^{Sc} de animales afectados por EEB (Pattison 1998). Las evidencias histopatológicas y bioquímicas permitieron establecer una relación entre la EEB y la vECJ y, aunque la ruta de transmisión nunca pudo ser definitivamente demostrada a pesar de las restrictivas prohibiciones para evitar que productos cárnicos contaminados con el agente causal de EEB llegaran a la alimentación humana, ésta sigue considerándose la vía más probable de infección. Para el año 2006 ya se habían diagnosticado más de 300 casos de vECJ en Reino Unido e Irlanda del Norte, 16 en Francia, 3 en la República de Irlanda, 2 en Estados Unidos y 1 caso en Portugal, España, Italia, Países Bajos, Japón y Canadá, todos ellos países con casos de EEB previos. La alarma social se vio incrementada además por la detección de transmisiones secundarias, de humano a humano, por vía iatrogénica en transfusiones de sangre y a pesar de que no se han reportado casos, por la posibilidad de infección debida a operaciones quirúrgicas ((Bradley, Collee et al. 2006), (Collee, Bradley et al. 2006)).

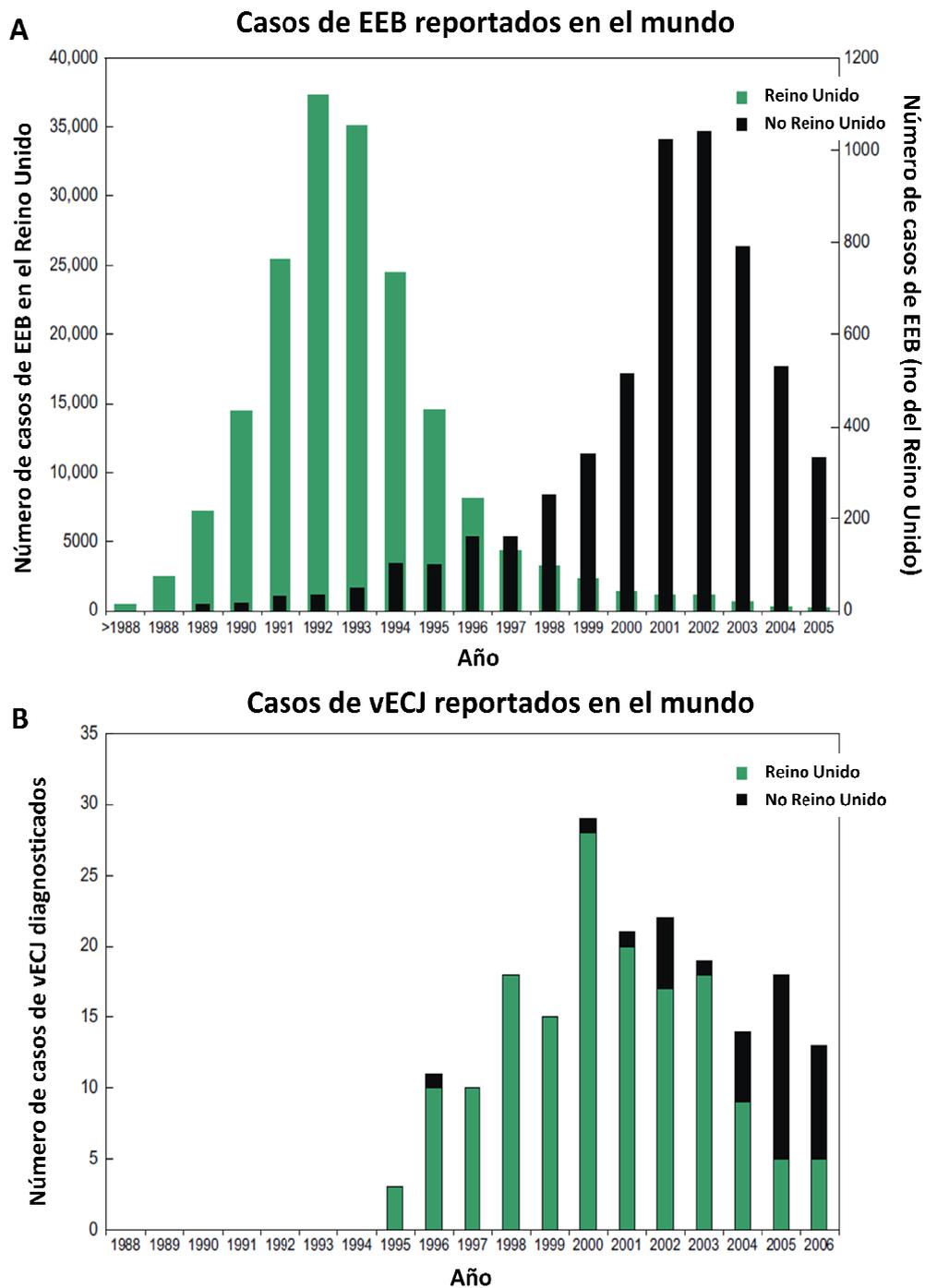


Figura 3. Representación gráfica de la incidencia de EEB y vECJ a nivel mundial reportada entre 1988 y 2006. A) Casos de EEB reportados en el Reino Unido y en otros países tanto de fuera de la Unión Europea (Canadá, Israel, Liechtenstein, Japón, Suiza y Estados Unidos) como de la Unión Europea excepto Reino Unido reportados hasta finales del año 2005. B) Casos de vECJ reportados en el Reino Unido y otros países (Francia, Italia, Irlanda, Estados Unidos, Canadá, Arabia Saudí, Japón, Holanda, Portugal y España) hasta Octubre de 2006 (Adaptado de (Aguzzi, Sigurdson et al. 2008)).

También relacionado con la EEB, cabe destacar la aparición en esa misma época de la Encefalopatía Espongiforme de Ungulados Exóticos (EUE) en rumiantes exóticos de la familia *Bovidae* de zoológicos británicos, solapado en el tiempo con la EEB y procedente de ésta (Imran and Mahmood 2011); así como la Encefalopatía Espongiforme Felina (EEF), detectada por primera vez en un gato doméstico en 1990 y con unos 80 casos diagnosticados en Reino Unido hasta el año 2000, aunque la incidencia bajó a partir de 1994. Hay similitudes bioquímicas e histopatológicas que indican que su origen también podría ser la EEB, adquirida mediante consumo de productos alimenticios contaminados, a lo que también apuntan los casos detectados en guepardos, pumas, ocelotes y tigres que consumieron carne de bovino cruda con sistema nervioso central incluido en zoológicos de Reino Unido ((Pattison 1998), (Imran and Mahmood 2011)).

1.6. La bioquímica y la biología molecular moderna respaldan la hipótesis de “sólo proteína”

La investigación en el área de las enfermedades priónicas recibió un fuerte impulso debido a la repercusión de la epidemia de EEB, lo que junto con los avances técnicos en el campo de la biología molecular hizo que se aumentaran los esfuerzos en el estudio de la naturaleza de este particular agente infeccioso. En realidad, mucho antes del desarrollo de la biología molecular moderna, desde el año 1920 se conocía el componente hereditario de enfermedades como la ECJ, debido a su naturaleza genética. Además, en la década de los 70 las investigaciones realizadas por Dickinson y colaboradores mediante métodos de genética clásica e inoculación de distintos aislados de scrapie en ratón, demostraron que el periodo de incubación en cada ratón inoculado con una cepa particular de scrapie dependía de un gen que se denominó *Sinc* (del inglés, *scrapie incubation*) y que también aparecía en ovejas, denominado SIP (del inglés, *Shorter incubation period*) en este caso (Dickinson, Meikle et al. 1968). A partir de estos mismos experimentos se desarrolló también el concepto de barrera de transmisión descrito poco antes por Pattison y colaboradores, relacionándolo ya no sólo a posibles diferencias en la dotación genética del agente causal, sino también a la dotación genética del huésped. A pesar de que inicialmente se consideró el descubrimiento de dichos genes como una evidencia a favor de que el agente causante del scrapie tiene ácidos nucleicos propios, la demostración por parte del grupo de Prusiner de que los genes *Sinc* y SIP eran en realidad diferentes alelos del gen de la propia PrP volvía a inclinar la balanza hacia la hipótesis de sólo proteína (Carlson, Kingsbury et al. 1986).

Desde entonces y hasta la actualidad, una gran variedad de datos ofrecen respaldo a la hipótesis de “sólo proteína”. Como los estudios de Alper y colaboradores sobre la inactivación y el tamaño de la

potencial partícula infecciosa o aquellos experimentos realizados por Prusiner y colaboradores demostrando la co-purificación de la fracción infecciosa con la PrP^{Sc} de 27-30 kDa resistente a proteínasa K (PK). Sus resultados demostraban que la concentración de la proteína era proporcional a la infectividad de la muestra y que ésta podía ser eliminada por agentes que desnaturalizan proteínas. O la reciente demostración de la generación *in vitro* de priones infecciosos utilizando PrP recombinante, considerada por muchos como la prueba definitiva (revisado en (Soto 2011)). Como ya se ha mencionado, la identificación del gen que codifica la PrP (*PRNP*) como único producto de un gen de copia única sin cambios significativos de expresión en individuos sanos y afectados y cuyos polimorfismos determinan el tiempo de incubación de la enfermedad, supuso otro paso decisivo en la consolidación de la hipótesis. Al no haberse identificado inicialmente diferencias entre las secuencias aminoacídicas entre PrP^C y PrP^{Sc}, se propuso que la PrP^{Sc} podría generarse a través de modificaciones post-traduccionales de la PrP^C ((Borchelt, Scott et al. 1990), (Caughey and Raymond 1991)). Sin embargo, el estudio detallado de las posibles modificaciones no pudo detectar ninguna diferencia química entre ambas moléculas (Stahl, Baldwin et al. 1993), por lo que se propuso que las diferentes propiedades de ambas isoformas de la PrP podrían estar determinadas por su conformación. Esto pudo confirmarse mediante análisis de ambas isoformas de la PrP por Espectroscopía infrarroja con transformación de Fourier (FTIR, del inglés *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) y por Dicroísmo circular (CD, del inglés *Circular Dichroism*), técnicas biofísicas que permiten simular las estructuras secundarias que adopta una determinada proteína y que mostraron que la conversión de PrP^C a PrP^{Sc} está asociada con una disminución en el contenido de hélices- α en favor de un aumento en la proporción de lámina- β ((Pan, Baldwin et al. 1993), (Pergami, Jaffe et al. 1996)). Dicho cambio conformacional explicaba las diferencias en las propiedades bioquímicas que distinguen la PrP^C de la PrP^{Sc}, como su insolubilidad en detergentes no iónicos (Meyer, McKinley et al. 1986) o la resistencia parcial a la digestión por PK (Cohen and Prusiner 1998). Además, concilió la idea del carácter infeccioso de la proteína 27-30 kDa y la existencia de 2 isoformas de una misma proteína comprendiéndose que el tratamiento del agente infeccioso con PK elimina aproximadamente los primeros 90 aminoácidos de la PrP^{Sc} dejando intacto un núcleo resistente de 27-30 kDa distinguible mediante *Western blot* de la PrP^C, sensible a la digestión por PK. El cambio conformacional y el aumento en la proporción de láminas- β , también explicó la tendencia a la agregación de la PrP^{Sc} en fibras amiloideas, cuya acumulación se observa en el cerebro de los individuos afectados formando diferentes tipos de depósitos (Fraser and Bruce 1973). Aún hoy, la presencia de fibras de PrP PK resistentes que se observan en cerebros de individuos afectados y que son reconocidas por anticuerpos anti-PrP siguen siendo el único marcador

patognomónico de la enfermedad, a pesar de que recientemente se han descubierto enfermedades priónicas causadas por formas de PrP^{Sc} sensibles a PK como la VPSPr (del inglés, *Variably Protease-Sensitive Prionopathy*) (Zou, Puoti et al. 2010).

Una vez conocido el gen de la PrP y centrada la atención en esta proteína, la asociación de mutaciones en la misma, con formas familiares de la enfermedad no tardó en ser descubierta. Hsiao y colaboradores relacionaron en 1989 la mutación P102L con el GSS familiar (Hsiao, Baker et al. 1989), lo cual supuso otro fuerte respaldo a la hipótesis de “sólo proteína”. Desde entonces y hasta la fecha se han identificado más de 40 mutaciones en el gen de la PrP humana que causan enfermedades priónicas de origen genético y que suponen alrededor del 10-15% de las enfermedades priónicas humanas, siendo el resto de origen infeccioso o las denominadas esporádicas, cuya causa se desconoce ((Collinge 2001), (Jeong and Kim 2014)).

1.7. Nuevos modelos animales respaldan la hipótesis de “sólo proteína”

El siguiente gran avance en lo referente a la naturaleza de este controvertido agente infeccioso vino de la mano del desarrollo de modelos murinos transgénicos. La sobreexpresión de una PrP con la mutación asociada a GSS mencionada previamente causaba una enfermedad neurodegenerativa similar a la GSS en humanos (Hsiao, Scott et al. 1990), aunque no resultó transmisible, siendo capaz únicamente de acelerar su aparición en el mismo modelo de sobreexpresión (Nazor, Kuhn et al. 2005). No obstante, otros modelos de expresión de PrP con mutaciones asociadas a EETs genéticas, además de dar lugar a enfermedad priónica espontánea en el modelo, han resultado también transmisibles a animales que expresan PrP de genotipo salvaje, demostrando inequívocamente que una mutación puntual en la PrP es suficiente para la aparición espontánea de una EET. Entre ellos destacan, el modelo de ratón transgénico que expresa una PrP bovina con una mutación asociada a GSS en humanos (Torres, Castilla et al. 2013), los ratones transgénicos *knock in* que expresan PrP de ratón con mutaciones asociadas a GSS y ECI (Jackson, Borkowski et al. 2013) y el modelo de ratón transgénico que expresa la PrP del topillo rojo, cuyo polimorfismo natural 109I resulta en malplegamiento espontáneo (Watts, Giles et al. 2012). También mediante la generación de un modelo de ratón transgénico, en este caso ratones a los que se ha eliminado el gen *PRNP* (*PRNP*^{-/-}), se demostró la implicación de la PrP^C en la patología de la enfermedad, dado que estos animales eran resistentes a la infección por scrapie, sin manifestación alguna de signos clínicos ni propagación y acumulación de PrP^{Sc} en el cerebro (Bueller, Aguzzi et al. 1993). Esto también supuso un respaldo importante a la hipótesis de “sólo proteína” y confirmó que la PrP^{Sc} se acumula en el cerebro a través de la conversión de la PrP^C, y de ahí que el nivel de expresión de

PrP^C está directamente relacionado con la tasa de formación de PrP^{Sc} e inversamente relacionado con el tiempo de incubación, como se vio en ratones hemicigotos para *PRNP* (*PRNP*^{+/-}) y que mostraban un tiempo de incubación muy prolongado frente a los homocigotos (Bueler, Raeber et al. 1994). También el desarrollo de modelos animales transgénicos que sobreexpresan PrP supuso un respaldo en esta dirección, pues mostraban tiempos de incubación más cortos que los animales que expresan únicamente PrP^C endógena, además de desarrollar la enfermedad espontáneamente con la edad, debido al exceso de PrP^C (revisado en (Watts and Prusiner 2014)).

1.8. Nuevos modelos *in vitro* respaldan la hipótesis de “sólo proteína”

Finalmente, el desarrollo de sistemas *in vitro* de propagación de priones además de suponer un gran avance en el modelado de una enfermedad con tiempos de incubación tan prolongados *in vivo*, supuso para muchos investigadores del área la demostración definitiva de la teoría propuesta por Prusiner más de una década antes. El primer sistema de este tipo, desarrollado por Byron Caughey y colaboradores y que se denominó como ensayo de conversión libre de células, demostró que la PrP^{Sc} purificada es capaz de convertir PrP^C purificada a PrP resistente a PK (PrP^{res}) sin la interacción de otros componentes. De esta forma se demostró que el proceso de conversión de PrP^C a la isoforma resistente a PK es catalizado por la PrP^{Sc} (Kocisko, Come et al. 1994).

Sin embargo, la obtención de priones infecciosos *in vitro* no se consiguió hasta el 2001 con el desarrollo de la técnica de propagación que protagoniza el trabajo que se describirá en esta tesis, la amplificación cíclica de proteínas malplegadas o PMCA (del inglés, *Protein Misfolding Cyclic Amplification*). Aunque se describirán más adelante y con más detalle los diferentes sistemas de replicación *in vitro* de priones, merece la pena mencionar que se trata de un sistema de ciclos de incubación y sonicación por el cual se puede obtener gran cantidad de PrP^{Sc} a través de la transformación de PrP^C partiendo de cantidades ínfimas de PrP^{Sc}, la cual actúa como semilla iniciadora de la reacción. La PMCA permitió por primera vez la obtención de grandes cantidades de PrP^{Sc} a partir de PrP^C *in vitro*, reproduciendo lo que ocurre en el sistema nervioso central de los individuos afectados, pero con una cinética acelerada (Castilla, Saa et al. 2005). El hecho de que el material generado *in vitro* mantenga las propiedades estructurales, biológicas y bioquímicas de la PrP^{Sc} original, supuso para muchos la demostración de uno de los puntos principales de la hipótesis de “sólo proteína”: que los priones pueden propagarse de forma indefinida en presencia de suficiente PrP^C y que la PrP^{Sc} generada en el proceso induce su mismo malplegamiento en la PrP^C en un proceso autocatalítico de conversión. Sin embargo, al proceder tanto la PrP^C como la PrP^{Sc} de encéfalos de animales, los escépticos ante la

hipótesis de Prusiner arguyeron que no habría demostración definitiva hasta que no se probara que se podía conseguir material infeccioso a partir de PrP pura y en ausencia de cualquier componente proveniente de encéfalos animales. Dicha evidencia, no tardó en llegar puesto que Legname y colaboradores, consiguieron en 2004 polimerizar PrP recombinante de ratón producido en *Escherichia coli* (*E. coli*) *in vitro* dando lugar a fibras amiloideas en ausencia de PrP^{Sc}. Tanto estas fibras producidas *de novo* como otras producidas mediante inoculación de la misma PrP recombinante con las fibras obtenidas previamente, dio lugar a 2 tipos distinguibles de patología tipo priónica al ser inyectadas en animales transgénicos que sobreexpresan PrP, aunque con tiempos de incubación muy largos comparados con los obtenidos por los priones provenientes de encéfalos de animales infectados (Legname, Baskakov et al. 2004). Sin embargo, estos descubrimientos no acabaron con el escepticismo de los detractores de la teoría de Prusiner, puesto que estos priones generados *de novo*, fueron capaces de inducir la patología únicamente en modelos transgénicos de sobreexpresión y no en animales de fenotipo salvaje. Como los animales que sobreexpresan la PrP desarrollaban patología priónica por sí solos con la edad, se arguyó que la inoculación de las fibras de PrP^{res} recombinante generadas *in vitro* podrían estar simplemente acelerando una condición preexistente.

El requisito de generar priones *in vitro* sin ningún componente del cerebro y con la capacidad de generar patología priónica en animales de genotipo salvaje que no fuesen a desarrollar la enfermedad de forma espontánea, también fue satisfecho al poco tiempo por Makarava y colaboradores. En 2010, mediante un proceso de fibrilización distinto al utilizado por Legname, convirtieron *in vitro* la PrP recombinante de hámster producida también en *E. coli*, obteniendo fibras que resultaron infecciosas en hámsteres de genotipo salvaje (Makarava, Kovacs et al. 2010). No obstante, el hecho de que el prion obtenido *in vitro* necesitara de una segunda inoculación para causar enfermedad, así como el hecho de que mostrara largos tiempos de incubación poco comunes en este tipo de animales,, llevaron a que esta evidencia fuese también insuficiente para los detractores de la hipótesis de “sólo proteína”.

Finalmente, lo que para muchos sería la prueba definitiva, llegó en el año 2010 de la mano de Jiyan Ma y colaboradores y de una de las técnicas más exitosas desarrollada para la propagación de priones *in vitro*, la PMCA. Aunque Kim y colaboradores pudieron generar con anterioridad priones a partir de PrP recombinante utilizando PMCA, se requirió de semillas de PrP^{Sc} además de la PrP recombinante y sales y la infectividad del producto resultante fue limitada (Kim, Cali et al. 2010). En cambio, el grupo de Ma pudo hacerlo de forma espontánea, sin adición de semillas de PrP^{Sc} y dando lugar a un prion generado *in vitro* con una gran infectividad en animales de genotipo salvaje, utilizando para complementar el

sustrato de PMCA, ARN y lípidos como cofactores junto con la PrP recombinante de ratón (Wang, Wang et al. 2010). Al no haber ningún componente procedente de purificaciones de encéfalos, el hecho de generar una clara enfermedad priónica en animales de genotipo salvaje de forma espontánea a partir de PrP recombinante, aunque con características ligeramente distintas a las de las enfermedades priónicas conocidas, ha supuesto para la gran mayoría de investigadores la confirmación definitiva del carácter exclusivamente proteico del agente infeccioso.

1.9. Hacia el fin de la controversia sobre la naturaleza del agente infeccioso

Actualmente, la discusión acerca de la naturaleza del agente infeccioso está prácticamente zanjada a pesar de que aún a día de hoy algunos investigadores se muestren escépticos y traten de buscar ácidos nucleicos específicos asociados a las enfermedades priónicas (Liberski 2012). Como se verá más adelante en profundidad, la existencia de diversas cepas caracterizadas por diferentes periodos de incubación y diferencias en la manifestación clínica e histopatológica, es uno de los principales argumentos contra la hipótesis de “sólo proteína”. En la mayoría de las enfermedades infecciosas la existencia de cepas se debe a la presencia de mutaciones o polimorfismos en el material genético del agente responsable. No obstante, la hipótesis de Prusiner se ha conciliado con el concepto de cepas mediante la propuesta de que éstas podrían ser fruto de ligeras diferencias en la conformación o estado de agregación de la PrP^{Sc} (Soto 2011). Lo cual viene respaldado por el hecho de que la PMCA puede reproducir las características de cepa de la semilla original (Castilla, Saa et al. 2005) o el hecho de que un grupo de compuestos basados en politiofenos interaccionan de manera diferente con cada cepa debido a sus diferencias estructurales (Magnusson, Simon et al. 2014). Además, la aparición a partir de mediados de los 90 de otras proteínas en una variedad de organismos que utilizan un cambio conformacional como el propuesto para los priones para transmitir información biológica ha reforzado aún más la validez de la hipótesis de “sólo proteína”. Merecen una breve mención las proteínas encontradas en levaduras en 1994 por Wickner, como Ure2 o Sup35, parte de un grupo de proteínas que se conocen como priones de levadura y que actúan como elementos de transmisión de información biológica heredándose en la división celular y confiriendo generalmente nuevos fenotipos metabólicos. Igual que con los priones de mamíferos, por un mecanismo que no se conoce aún en detalle, los priones de levadura pueden adquirir una conformación diferente a la nativa e inducir la misma conformación en otras proteínas del mismo tipo. Pero a diferencia de los priones de mamíferos, lejos de tener un efecto patológico, el mecanismo forma parte de los procesos normales de la célula, como forma de modulación de la actividad de las proteínas sin necesidad de alterar su información genética (Wickner, Shewmaker et al. 2015). En 2003,

se encontró otro elemento de este tipo, en este caso en una babosa marina (*Aplysia californica*), cuya proteína CPEB (del inglés, *Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding protein*) relacionada con procesos de traducción de ARNm durante procesos de plasticidad sináptica y formación de memoria, pasa por un cambio conformacional y por la inducción del mismo cambio en CPEB cercanas (Si, Lindquist et al. 2003). También en 2011 se encontró otra proteína con características de prion en cultivos celulares de origen humano denominado MAVS (del inglés, *Mitochondrial AntiViral Signaling*) e implicado en la respuesta inmunológica innata. Su activación frente a ataques víricos viene mediada por un cambio conformacional auto-catalítico igual que para los priones, demostrando que el mecanismo del cambio conformacional que se da en las EETs no es tan único y exclusivo como se creía y que además de las consecuencias patológicas también supone un potente mecanismo epigenético que regula funciones proteicas y fenotipos celulares (Hou, Sun et al. 2011).

El descubrimiento e inclusión de proteínas bajo el concepto de prion prosigue actualmente, puesto que se han visto características comunes en otras proteínas implicadas en enfermedades caracterizadas por la presencia de agregados proteicos específicos. Entre ellas se encuentran las proteínas β -amiloides y tau implicadas en la enfermedad de Alzheimer, la α -sinucleína asociada a la enfermedad de Parkinson y diversas proteínas implicadas en la Esclerosis lateral amiotrófica entre otras, lo que redimensionaría el área de investigación en enfermedades priónicas al tratarse de enfermedades con una elevada prevalencia y su consiguiente impacto económico y social (Fernandez-Borges, Erana et al. 2015).

A pesar de que ya no hay dudas sobre la naturaleza exclusivamente proteica del agente infeccioso causante de las EETs, aún quedan muchos aspectos de la enfermedad por esclarecer como la determinación de la estructura de la PrP^{Sc}, el mecanismo molecular de conversión de PrP^C a PrP^{Sc} tanto en presencia como en ausencia de semilla, si hay algún cofactor más implicado en la conversión además de la propia PrP, la cascada de eventos que culmina en neurotoxicidad, los determinantes estructurales del fenómeno de la aparición de cepas, así como qué determina la barrera de transmisión interespecies. Por tanto, a pesar de todo lo que se ha avanzado en el conocimiento del controvertido agente causal de las enfermedades priónicas, todos los anteriores interrogantes siguen sin respuesta. Aunque probablemente no por mucho tiempo dado el intensivo esfuerzo de los investigadores y todas las herramientas desarrolladas en los últimos años para su esclarecimiento.

2. PrP^C, PrP^{Sc} y el mecanismo de conversión

Hace casi 3 décadas que se identificó y clonó el gen que codifica la proteína del prion, el gen *PRNP* (Basler, Oesch et al. 1986), de copia única y cuyo marco de lectura abierto (ORF, del inglés *Open Reading Frame*) está contenido en un sólo exón en todas aquellas especies de mamíferos y aves en las que se ha estudiado (revisado en (Aguzzi and Calella 2009)). El gen se encuentra en el brazo corto del cromosoma 20 en humanos y en la región homóloga del cromosoma 2 en ratón, el primero formado por 2 exones con el ORF codificado en el segundo, mientras en ratón, oveja, vaca o rata se han detectado 3 exones y el ORF está codificado en el tercero (Prusiner, Scott et al. 1998).

2.1. PrP^C

La PrP, cuya representación esquemática se muestra en la figura 4, tiene alrededor de 250 aminoácidos con pequeñas variaciones para cada especie de mamífero, pero todas con una señal peptídica de secreción en el extremo amino terminal que la dirige a la membrana plasmática y es eliminada durante su procesamiento. Su expresión comienza pronto durante la embriogénesis y se expresa de forma prácticamente ubicua en todo el organismo, con los mayores niveles de expresión en las células del sistema nervioso central en individuos adultos, principalmente en neuronas (Westergard, Christensen et al. 2007). Igual que para muchas otras proteínas secretadas o de membrana plasmática, el proceso de biosíntesis comienza en los ribosomas unidos al retículo endoplásmico (RE) desde donde a través del aparato de Golgi es dirigido a la membrana. Prácticamente toda la PrP^C se encuentra en balsas lipídicas en la membrana aunque una parte también es transferida a algunas zonas recubiertas de clatrina donde queda sujeta a endocitosis y reciclaje constitutivo (Lloyd, Mead et al. 2011). El extremo amino terminal de la PrP madura, que consiste en los aminoácidos de 23 a 124 en humanos, conforma un dominio flexible y poco estructurado según la estructura que presenta en Resonancia Magnética Nuclear (RMN) (Riek, Hornemann et al. 1997). Contiene una región denominada zona de octa repeticiones (OR, del inglés *Octapeptide Repeats*) caracterizada por 4 o 5 repeticiones, en función de la especie, de una secuencia variable de 8 aminoácidos (como por ejemplo PHGGGWGQ) altamente conservada en todos los mamíferos (Zahn 2003). Es una zona que ha atraído la atención de muchos investigadores y no sólo por su elevado grado de conservación, si no debido a que las inserciones de octa repeticiones son la causa de la existencia de algunas formas heredadas de EETs ((Pietrini, Puoti et al. 2003), (Vital, Laplanche et al. 2011), (Sanchez-Valle, Yague et al. 2012)) y también porque se cree que podrían ser clave en la función fisiológica de la PrP^C que aún a día de hoy se desconoce. Esto último se debe a que se ha demostrado *in vitro* que es una zona que puede coordinar cationes bivalentes, con especial afinidad para el Cu²⁺ o también a que puede unir heparán sulfato, gracias a cuya unión parece

poder interaccionar con el receptor de la laminina. A pesar de ello, sigue sin conocerse su implicación tanto en la desconocida función fisiológica de la PrP^C, como en su tendencia a la agregación (Zahn 2003). Flanqueando la zona de los OR hay 2 pequeñas regiones cargadas positivamente conocidas como CC1 y CC2 (del inglés, *Charged Cluster*), y entre todo este dominio desestructurado y el dominio globular del extremo carboxilo terminal hay una región hidrofóbica conocida como HC (del inglés, *Hydrofobic Core*).

El dominio globular, donde se localizan la mayoría de las mutaciones puntuales asociadas a EETs de origen genético (Lloyd, Mead et al. 2011), presenta un alto grado de conservación estructural entre las diferentes especies de mamíferos, en concordancia con la gran similitud entre las secuencias primarias de los mismos. Pero curiosamente, a pesar de la baja similitud entre las secuencias de las PrP^C de pollo (*Gallus gallus*), tortuga (*Trachemys scripta*) y rana (*Xenopus laevis*) respecto a las de mamíferos, de alrededor de un 30%, los elementos estructurales también están altamente conservados, todas ellas con 2 pequeñas regiones de hoja-β separadas por la primera región α-helicoidal y seguidas de otras 2 hélices-α (Calzolari, Lysek et al. 2005). Además, el dominio contiene un puente disulfuro entre las 2 últimas hélices y 2 Asparaginas, Asn-181 y Asn-197 en humanos y Asn-180 y Asn-196 en ratón, que son glicosiladas de forma variable, dando lugar a PrP^C no glicosilada, monoglicosilada y diglicosilada. A pesar de que las diferentes proporciones de las 3 formas de PrP se utilizan para la distinción y caracterización de cepas de priones, no se conoce qué papel pueden jugar los diversos N-glicanos que pueden encontrarse en la PrP^C en su función biológica ni en el proceso de conversión de PrP^C a PrP^{Sc} (revisado en (Aguzzi and Calella 2009)).

La última característica remarcable de la PrP^C madura es su anclaje a membrana mediante un GPI (del inglés, *Glycosylphosphatidylinositol*), que es añadido en el extremo carboxilo terminal durante su maduración. Esta forma de anclaje a la membrana está altamente conservada en eucariotas, dado que alrededor del 10-20% de las proteínas de membrana se encuentran unidas a ésta mediante un GPI. La unión GPI-proteína se da a través de una compleja vía en la que están implicadas más de 20 enzimas en unas 10 reacciones que tienen lugar en el RE y que no se conocen completamente. Por el contrario, se sabe que todas las proteínas ancladas a través de un GPI contienen una secuencia señal en el extremo amino terminal que las dirige al RE y que, una vez en este orgánulo, una segunda secuencia señal hidrofóbica del extremo carboxilo terminal es eliminada mediante una transaminidasa que añade a la proteína un GPI preformado. Todos los GPIs comparten una estructura común formada por una etanolamina fosfato unida mediante conexión amida al grupo carboxilo terminal de la proteína, con un núcleo glicano altamente conservado de tres residuos de manosa, glucosamina, un grupo

fosfatidilinositol y colas fosfolipídicas que anclan el GPI a la membrana celular (figura 4). La adición de ramificaciones laterales de glúcidos y la modificación de la fracción lipídica del GPI durante su paso por la vía secretora hasta la membrana plasmática, depende del tipo celular y del organismo, dando lugar a una gran diversidad de GPIs, entre las que la PrP^C destaca debido a que es una de las 3 únicas proteínas con GPI que se conocen que contiene ácido siálico en su estructura (Puig, Altmeppen et al. 2014). El hecho de que las proteínas ancladas a la membrana a través de un GPI están implicadas en una gran variedad de funciones, no proporciona ninguna pista sobre la función de la PrP, sin embargo, se cree que el anclaje mediante GPI tiene ciertas ventajas respecto a otros tipos de unión como pueden ser una mayor movilidad en la membrana, la ocupación de menor espacio en el dominio transmembrana permitiendo una mayor densidad de proteínas, así como la habilidad de insertarse espontáneamente en membranas tanto *in vivo* como *in vitro*. Su implicación en el desarrollo de la patología priónica ha sido demostrada en repetidas ocasiones. Por un lado, a través de la importancia que tiene para su localización en las balsas lipídicas, cuya alteración mediante compuestos que desestabilizan estas regiones de la membrana o mediante la expresión de una PrP mutada con capacidad para anclarse a otras zonas de la membrana, provoca una reducción o inhibición de la formación de PrP^{Sc} (Puig, Altmeppen et al. 2014); y por otro lado mediante la generación de modelos transgénicos de ratón que expresan una PrP^C sin GPI, que a pesar de presentar malplegamiento y grandes placas de PrP^{Sc} al ser infectado por priones de ratón, muestran además, ausencia de la marcada espongiosis que caracteriza la gran mayoría de EETs, lo que sugiere una reducción de la neurotoxicidad (Chesebro, Race et al. 2010). Aunque se profundizará en este tema más adelante, existen diversas evidencias que indican que en las enfermedades priónicas tienen lugar 2 fenómenos relacionados pero independientes: i) La conversión de PrP^C a PrP^{Sc}, también denominada propagación y ii) la neurotoxicidad, probablemente dependiente del anclaje a membrana de la PrP^C mediante GPI como indica el modelo que expresa PrP sin GPI. También apuntan en la misma dirección experimentos realizados por Lewis y colaboradores que demostraron que la eliminación por medios químicos del anclaje a GPI en priones preformados no disminuye su infectividad al ser inoculados en animales que expresan PrP anclada por GPI (Lewis, Properzi et al. 2006). De forma que diversas evidencias indican que el efecto del GPI en la patología es independiente de la capacidad de malplegarse e inducir malplegamiento.

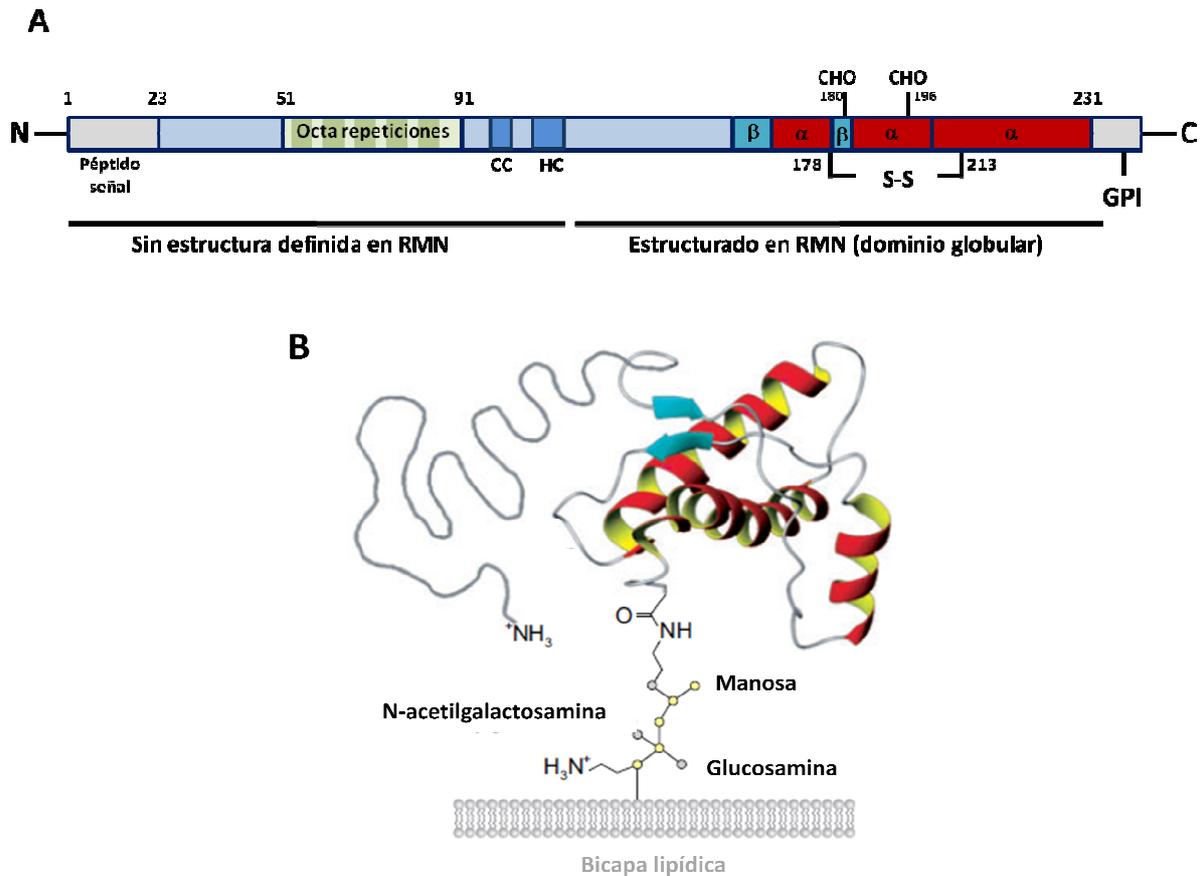


Figura 4. Representación esquemática de la PrP^C y estructura de la PrP^C resuelta por RMN. A) representación esquemática de la estructura primaria de la PrP^C y modificaciones postraduccionales. Los números hacen referencia a la posición de aminoácido. En el extremo N-terminal contiene una señal peptídica de secreción, seguido por la región de octa repeticiones (indicado en verde), tras lo cual vienen los motivos CC, con residuos cargados positivamente, y el HC o núcleo hidrofóbico que separa el dominio desestructurado y el globular. Ya en el dominio globular se indican las estructuras secundarias que presenta, las 3 hélices- α (en rojo) y las 2 hojas- β (en azul). Se señalan además el puente disulfuro (S-S) y los dos sitios de glicosilación (CHO). Finalmente en el extremo C-terminal, se muestra en gris la zona de anclaje a membrana, donde se unen la proteína y el GPI. B) Estructura terciaria de la PrP^C deducida de RMN anclada a una membrana lipídica mediante el GPI. Las hélices- α señaladas en rojo y las hojas- β antiparalelas en azul. (Adaptado de (Aguzzi, Sigurdson et al. 2008)).

A pesar del amplio conocimiento que se tiene de la biosíntesis, estructura e implicación en la enfermedad de la PrP^C, su función biológica sigue siendo una incógnita. Su ubicuidad y alto grado de conservación en mamíferos y probablemente en todos los vertebrados parecen señalar hacia una función esencial, pero los modelos animales generados como ratones, cabras y vacas carentes de PrP^C no muestran ningún fenotipo obvio salvo la resistencia a enfermedades priónicas (Richt, Kasinathan et al. 2007). Además de este hecho, varios estudios indican la necesidad de una PrP^C funcional para la

patofisiología de la enfermedad, concretamente para que se desencadene la neurotoxicidad y la consiguiente neurodegeneración, como demuestran los animales sin GPI mencionados antes ((Lewis, Properzi et al. 2006), (Chesebro, Race et al. 2010)) o el estudio en que se demuestra que un injerto que expresa PrP^C implantado en el encéfalo de animales *PRNP*^{-/-} es el único tejido afectado por neurotoxicidad a pesar de que la PrP^{Sc} abarca todo el encéfalo (Brandner, Isenmann et al. 1996). Por tanto, parece que al menos una función de la PrP^C es como mediador de neurotoxicidad en la enfermedad priónica y tal y como se ha descrito recientemente, también en la enfermedad de Alzheimer por interacción con el péptido A β (beta amiloide) y probablemente con otros péptidos ricos en hoja- β implicados en otras enfermedades neurodegenerativas (Biasini, Turnbaugh et al. 2012). Sin embargo, es improbable que una proteína tan conservada evolutivamente tenga como única función biológica la mediación de neurotoxicidad. De hecho, las evidencias apuntan a que la PrP^{Sc} necesita de la PrP^C para causar neurotoxicidad, lo que podría darse mediante alteración de la actividad normal de la PrP^C. Conocer la función fisiológica no asociada a estas patologías resulta esencial dado que podría ser clave para la comprensión de los mecanismos de toxicidad no sólo en EETs sino también en otras enfermedades neurodegenerativas.

A pesar de que la PrP^C se conoce desde hace ya dos décadas, su función sigue siendo incierta. No obstante, a las aproximaciones tradicionales al sistema, que se basaban en el estudio de los ratones sin PrP^C e identificación bioquímica de moléculas que interaccionan con la PrP^C, se han sumado recientemente nuevos modelos y ensayos para descifrar las funciones asociadas a la PrP^C en una gran variedad de cultivos celulares y ratones transgénicos además de un modelo que resulta muy útil para este propósito como es el pez cebra (*Danio rerio*). Todos estos esfuerzos conjuntos han dado lugar a todo un repertorio de posibles funciones de la PrP^C, que podría estar implicada en adhesión celular, desarrollo de neuritas, excitabilidad neuronal, citotoxicidad, citoprotección y con actividad de canal iónico (ampliamente revisado en (Nicolas, Gavin et al. 2009), (Biasini, Turnbaugh et al. 2012), (Halliez, Passet et al. 2014)). Sin embargo, muchas de las funciones descubiertas necesitan ser validadas, como es el caso de las interacciones detectadas de proteínas con PrP^C cuyo significado biológico se desconoce en la mayoría. Así mismo, los mecanismos moleculares detrás de varios efectos observados necesitan ser aclarados, como las vías de señalización por las que la PrP^C puede mediar la neurotoxicidad o por el contrario la citoprotección, lo cual muestra que aún queda mucho por hacer en este aspecto (Biasini, Turnbaugh et al. 2012). No obstante, alguna de las posibles funciones identificadas para la PrP^C cuenta con claras evidencias a favor, como es el caso de su posible función en la conservación de la integridad de la mielina periférica demostrada por Bremer y colaboradores. Tras la ablación de la *PRNP* en

neuronas de cuatro cepas de ratón diferentes observaron que desarrollaban una polineuropatía desmielinizante crónica, indicando que la expresión de PrP^C funcional en neuronas es indispensable para la conservación de la mielina (Bremer, Baumann et al. 2010).

2.2. Mecanismo de conversión a PrP^{Sc}

En contraste con la amplia información de que se dispone sobre la estructura y rutas de biosíntesis de la PrP^C, el conocimiento acerca de la isoforma causante de la enfermedad, es más bien escaso. Al igual que ocurre con otros muchos aspectos de las enfermedades priónicas, los eventos moleculares que conducen a la conversión de la PrP^C en PrP^{Sc} son desconocidos, aunque de acuerdo con la hipótesis de “sólo proteína” tiene lugar un malplegamiento proteico que se propaga de forma auto-catalítica. Como se ha mencionado anteriormente, las EETs se caracterizan por la presencia de placas en el cerebro de los individuos afectados y que están formadas por fibras amiloideas, compuestas a su vez por PrP mayoritariamente. Una importante diferencia, entre la PrP^C y la PrP que forma dichas placas amiloideas, aunque controvertida por la falta de evidencias sólidas, es su composición estructural. La PrP^C, una forma rica en alfa hélices (~40% hélice- α y ~3% hoja- β) y la PrP^{Sc}, rica en láminas beta (~40% hoja- β y ~30% hélice- α) lleva a que presenten importantes diferencias bioquímicas y biológicas ((Safar, Roller et al. 1993), (Pan, Baldwin et al. 1993)). Sin embargo, evidencias en contra de la presencia de hélices alfa en la PrP^{Sc} han ido surgiendo de la mano de técnicas biofísicas cada vez más sofisticadas como la RMN en estado sólido (Grovetman, Dolan et al. 2014), por lo que a diferencia de un indudable aumento en la proporción de hoja beta, la existencia de estructuras alfa helicoidales en la PrP^{Sc} sigue siendo controvertida. Además del cambio en la capacidad de agregación, la PrP^{Sc} es insoluble en detergentes no iónicos (Meyer, McKinley et al. 1986) y presenta una resistencia parcial a digestión por PK (Cohen and Prusiner 1998), propiedades que se han utilizado ampliamente para distinguirla de la PrP^C. El tratamiento con PK elimina alrededor de los primeros 90 aminoácidos de la PrP^{Sc}, manteniéndose intacto un núcleo resistente a la misma de 27-30 kDa frente a la proteína completa de 33-35 kDa. La solubilización de esta PrP²⁷⁻³⁰ o PrP^{Sc} en liposomas retienen su infectividad, sugiriendo que los grandes agregados de PrP^{Sc} no son necesarios para ello y que por consiguiente, oligómeros de PrP^{Sc} podrían constituir los verdaderos centros de nucleación para la propagación de los priones (Gabizon, McKinley et al. 1987). Para evaluar esta relación entre infectividad, capacidad de propagación y tamaño de la PrP^{Sc}, Silveira y colaboradores desagregaron parcialmente PrP^{Sc} fraccionando las especies resultantes de acuerdo a su tamaño e inoculando las diferentes fracciones en hámsteres, que demostraron un pico de infectividad de las fracciones que contenían partículas de 300-600 kDa (17-27 nm), equivalente a la

masa de 14-28 moléculas de PrP (Silveira, Raymond et al. 2005). Por tanto, parece que los iniciadores más efectivos de EETs no son los grandes agregados amiloideos, que podrían ser en cambio formados como mecanismo protector ante los pequeños oligómeros subfibrilares más peligrosos y secuestrados en las relativamente inocuas placas amiloideas (revisado en (Aguzzi and Calella 2009)). Estudios con ratones transgénicos que expresan PrP de hámster junto con la PrP endógena de ratón (Prusiner 1990) y otros en que se expresaba una PrP soluble y dimérica gracias a su unión a un dominio de inmunoglobulina (Meier, Genoud et al. 2003), revelaron que la conversión de PrP^C a PrP^{Sc} tiene lugar mediante la formación de un complejo PrP^C/PrP^{Sc}. A pesar de todo, nunca se ha podido aislar o purificar este complejo por lo que se desconoce si en el mismo podría participar otro componente (revisado en (Aguzzi and Calella 2009)). El primero de los estudios mencionados, mostró además que la formación del complejo parecía estar favorecida por secuencias aminoacídicas idénticas de la PrP^C y la PrP^{Sc}, respaldando la relación entre la barrera de transmisión interespecies con una mayor dificultad para la formación del complejo PrP^C/PrP^{Sc}. De hecho, un estudio que se detallará más adelante confirmó y refinó esta observación utilizando PrP de hámster y ratón en el sistema *in vitro*. Este estudio demostró que las PrP^C y PrP^{Sc} de ambas especies podían unirse y formar un complejo entre sí aunque con una tasa de conversión muy reducida, sugiriendo que la diferencia de aminoácidos entre el prion y su sustrato es más importante en el proceso de malplegamiento que en la unión inicial y, por tanto, podrían darse interacciones moleculares adicionales durante el proceso (Horiuchi, Priola et al. 2000). Con este limitado conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la propagación de la PrP^{Sc} mediante malplegamiento de la PrP^C y de acuerdo con la hipótesis de “sólo proteína”, se barajan 2 modelos que describen la conversión conformacional (figura 5):

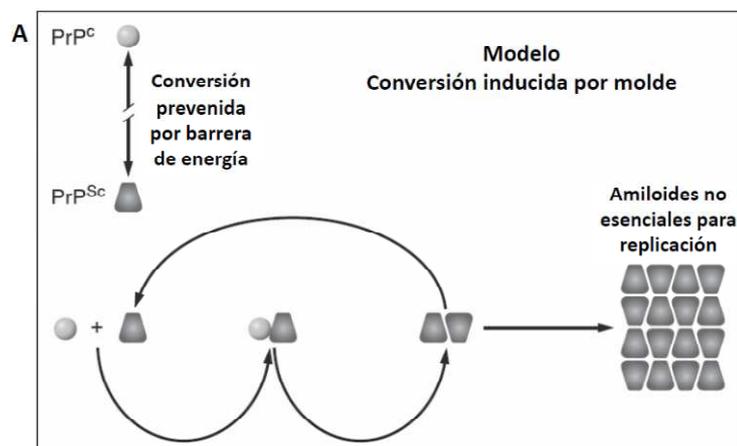
Modelo de conversión inducida por molde

Este modelo teoriza una interacción entre la PrP^{Sc} y la PrP^C que induce el malplegamiento de la PrP^C actuando la PrP^{Sc} como molde para ello. En este caso, la conversión espontánea de PrP^C a PrP^{Sc} está prevenida o al menos muy desfavorecida debido a una alta barrera energética. Para explicar la aparición espontánea de priones, la teoría propone la existencia de un equilibrio entre la PrP^C y un estado conformacional alternativo denominado PrP*, un intermediario transitorio que participa en la formación de PrP^{Sc}, bien a través de su unión a PrP^{Sc} o a otra molécula de PrP*. La formación de la PrP* estaría catalizada por la unión de PrP^C a la denominada proteína X, un factor adicional necesario para el proceso de conversión. Con este modelo, las diferentes formas de enfermedades priónicas se explican de la siguiente manera:

Cuando el origen de la enfermedad es por infección, la fuente exógena de PrP^{Sc} desencadenaría el proceso de conversión mediante su unión a PrP^{*} creando un heterodímero que posteriormente sería transformado en un homodímero de PrP^{Sc}; en las formas hereditaria de las EETs la concentración de PrP^{*} aumenta debido a un efecto desestabilizador de la mutación y/o un incremento en la estabilidad del dímero PrP^{*}/PrP^{*} lo que aumenta la probabilidad de que un dímero se convierta en homodímero de PrP^{Sc} e inicie el ciclo de replicación; y finalmente, para explicar las formas esporádicas, el modelo postula la ocurrencia de un evento molecular muy infrecuente como la formación de un complejo PrP^{*}/PrP^{*} o una mutación somática que conduzca a una formación de PrP^{Sc} de forma que la enfermedad se desarrollaría como en el caso de las hereditarias (Cohen and Prusiner 1998).

Modelo de nucleación-polimerización

A diferencia del modelo anterior, éste propone un equilibrio termodinámico reversible entre PrP^C y PrP^{Sc} en solución. Debido a la inestabilidad de la PrP^{Sc} monomérica, ésta tiende a la agregación con otras moléculas de PrP^{Sc} para alcanzar la estabilidad, de forma que el equilibrio termodinámico se desplaza hacia la formación de PrP^{Sc} (Caughey, Kocisko et al. 1995). El proceso se caracteriza por una fase inicial de latencia en la que varias moléculas de PrP^{Sc} monoméricas se agregan estabilizando así los monómeros mediante la formación de un núcleo o semilla infecciosa. Una vez formado el núcleo vendría la fase de crecimiento del polímero mediante el reclutamiento y agregación de PrP^{Sc} al núcleo en expansión. Probablemente, la posterior fragmentación de los agregados de PrP^{Sc} aumenta el número de núcleos que a su vez pueden reclutar más PrP^{Sc} favoreciendo la cada vez más rápida propagación del agente.



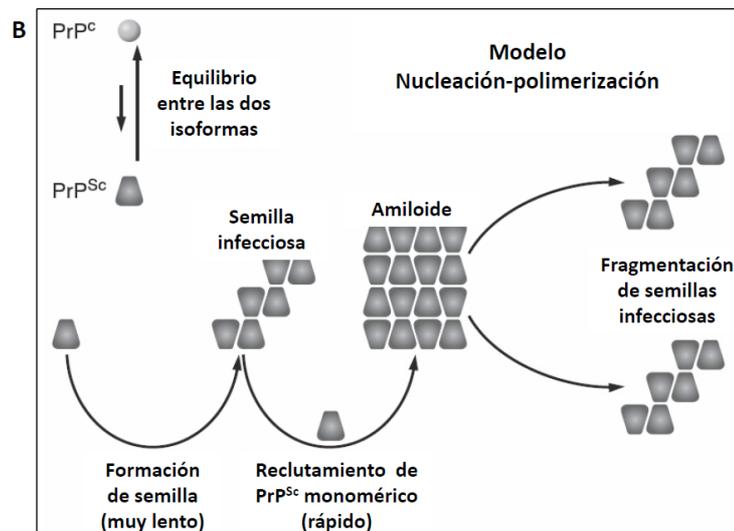


Figura 5: Representación esquemática de los distintos modelos de conversión de priones. A) Modelo de conversión inducida por molde. **B)** Modelo de nucleación-polimerización (Figura adaptada de (Aguzzi and Calella 2009)).

Una de las mayores incógnitas respecto a la conversión de PrP^C a PrP^{Sc} es la existencia de un factor X que podría o bien formar parte del agente infeccioso o bien ser un componente celular que facilite la conversión pero no formar parte del agente. Según el modelo de conversión inducida por molde, un factor X, probablemente proteico, catalizaría la formación del heterodímero (Abid and Soto 2006), por lo que la detección de dicho factor supondría un respaldo importante a este modelo. No obstante, la generación de priones recombinantes *in vitro* con componentes altamente definidos y purificados: PrP recombinante, ARNm y lípidos, apuntan a que dicho factor X no es ningún componente proteico específico sino más bien, un componente celular abundante que sin llegar a formar parte del agente infeccioso podría actuar como asistente de la conversión (Wang, Wang et al. 2010). Otras evidencias que apoyan también el modelo de nucleación-polimerización frente al de conversión inducida por molde son los modelos matemáticos ((Masel and Jansen 2001), (Masel, Jansen et al. 1999)) y los datos cuantitativos obtenidos en experimentos de conversión libre de células. Éstos últimos demuestran la necesidad de oligómeros mayores que el dímero postulado por el modelo de conversión inducida por molde para propagar la enfermedad (Silveira, Raymond et al. 2005), así como la caracterización morfológica de los agregados como polímeros no ramificados y de diámetro relativo constante ((Prusiner, McKinley et al. 1983), (Jeffrey, Goodbrand et al. 1995)). Aun así, ambos modelos albergan incógnitas que no permiten la aceptación de uno u otro con seguridad, puesto que tanto la existencia y naturaleza del factor de conversión como la naturaleza de formas intermedias como la PrP*, siguen siendo desconocidas.

2.3. PrP^{Sc}

Más allá de cómo sucede la conversión, la estructura tridimensional de los oligómeros y polímeros de PrP^{Sc} también es un campo de investigación intensiva e igualmente desconocida. La resolución de la estructura de la PrP^{Sc} podría ser la clave para comprender los mecanismos de replicación, así como los de neurotoxicidad o las bases moleculares que definen la barrera de transmisión interespecies y la existencia de diferentes cepas. Sin embargo, la resolución de la estructura tridimensional de la PrP^{Sc} se enfrenta a diversos obstáculos, empezando por la composición de la PrP^{Sc}, que al estar formado por diferentes polímeros de tamaño variado en equilibrio dinámico, dificulta el estudio de la unidad básica de la PrP^{Sc} (Silveira, Raymond et al. 2005). También el alto peso molecular de los agregados de PrP^{Sc} y las mezclas variables de formas sin glicosilar, monoglicosiladas y diglicosiladas representan un importante obstáculo para las técnicas biofísicas clásicas como la Cristalografía de rayos X o RMN (Diaz-Espinoza and Soto 2012). La hidrofobicidad de los agregados de PrP^{Sc}, insolubles en agua, es otro de los factores que dificulta su estudio, puesto que en las condiciones requeridas para la mayoría de estudios estructurales, la PrP^{Sc} forma agregados no cristalinos que no pueden solubilizarse con detergentes sin comprometer su infectividad ((Gabizon, McKinley et al. 1987), (Wille, Zhang et al. 1996)). Finalmente, la dificultad a la hora de purificar PrP^{Sc} de cerebros debido a su carácter viscoso, se suma a los impedimentos para la determinación de su estructura, dada la presencia de contaminantes que co-purifican con la PrP^{Sc} como otras proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Diringer, Beekes et al. 1997). No obstante, el gran desarrollo de las tecnologías para la producción de priones infecciosos *in vitro*, podría dar solución pronto a la dificultad de obtener priones infecciosos puros y en cantidades suficientes para los estudios biofísicos, siempre y cuando se mejore un poco el rendimiento en la obtención de dicho material.

A pesar de las limitaciones descritas, actualmente se dispone de ciertos datos provenientes principalmente de técnicas biofísicas de baja resolución que han generado un número considerable de modelos diferentes (Diaz-Espinoza and Soto 2012). Algunas de las primeras técnicas de baja resolución utilizadas fueron el Dicroísmo Circular y la espectroscopia FTIR que mostraron la predominancia de la hoja- β frente a la mayoritariamente α -helicoidal PrP^C para diversas cepas y especies ((Pan, Baldwin et al. 1993), (Safar, Roller et al. 1993), (Aucouturier, Kascsak et al. 1999)). También la proteólisis limitada ha aportado datos relevantes en este sentido puesto que su resistencia parcial a la digestión proteolítica es conocida prácticamente desde la identificación de la PrP como agente causante (McKinley, Bolton et al. 1983). La PK digiere un fragmento de unos 12 kDa de extremo amino terminal de la PrP^{Sc}, resultando en la forma PrP²⁷⁻³⁰, por su tamaño en *Western blot*, y que retiene la capacidad infecciosa. Este resultado

indica que los aproximadamente primeros 90 aminoácidos son prescindibles para la conversión y la propagación de la PrP^{Sc}. La diferente susceptibilidad de diversas cepas a la proteólisis limitada, así como las distintas zonas de corte, se utilizan para su distinción, lo cual también indica que el plegamiento y la agregación de cada cepa es ligeramente diferente a otras ((Parchi, Castellani et al. 1996), (Cronier, Gros et al. 2008)). El mapeo de epítomos accesibles con diferentes anticuerpos monoclonales es otro de los métodos que ha proyectado algo de luz sobre cómo se estructura la PrP^{Sc}. El estudio de la accesibilidad de determinadas zonas del polímero mediante anticuerpos que reconocen distintos epítomos de la PrP ha revelado que del residuo 90 al 120 aproximadamente hay una zona inaccesible a menos que se desnaturalice completamente la PrP mientras que regiones del carboxilo terminal como las que van del aminoácido 152-163 y de 225-231 son accesibles ((Peretz, Williamson et al. 1997), (Williamson, Peretz et al. 1998)). También han aportado detalles, en este caso sobre la ultra estructura de los agregados priónicos, la microscopía electrónica de transmisión (del inglés, *Transmission Electron Microscopy*, TEM) ((Merz, Somerville et al. 1983), (McKinley, Braunfeld et al. 1986)) y más recientemente la microscopía de fuerza atómica (del inglés *Atomic Force Microscopy*, AFM) (Sim and Caughey 2009). Habitualmente, las moléculas de PrP aisladas de encéfalo se ven en microscopía electrónica como agregados amorfos de tamaños heterogéneos aunque mediante exhaustivos protocolos de purificación que incluye tratamientos prolongados con proteasa, se desvelan estructuras reconocibles y bien definidas que se han denominado varillas priónicas (*prion rods*, en inglés). Estas varillas de entre 10 y 100 nm de largo y 5 nm de ancho son habitualmente más cortas que otras fibras amiloideas y no muestran diferencias apreciables para distintas cepas aunque ensayos de velocidad de sedimentación han demostrado ciertas diferencias en los patrones de distribución por tamaños para las distintas cepas ((Colby, Giles et al. 2009), (Tixador, Herzog et al. 2010)). A pesar de que no se han podido obtener cristales adecuados de PrP^{Sc} a partir de encéfalo para estudiar su estructura mediante cristalografía y difracción de rayos X, sí han podido obtenerse patrones de difracción de baja resolución de las fibras (Eanes and Glenner 1968). Los datos obtenidos resultan útiles para estudiar el empaquetamiento de los núcleos resistentes a proteasas, así como la organización general de los agregados. Esta técnica se ha utilizado ampliamente para el estudio de la organización fibrilar de diversos amiloides ((Nelson, Sawaya et al. 2005), (Wiltzius, Sievers et al. 2008)) revelando un motivo estructural denominado *cross-β-sheet* o *spine*, en el que la hojas-β se apilan perpendicularmente al eje longitudinal de la fibra. Los datos obtenidos para la PrP²⁷⁻³⁰ muestran un motivo típico de agregados amiloideos similar al empaquetamiento cross-β habitual de los amiloideos pero con importantes diferencias ((Wille, Bian et al. 2009). Otra técnica cristalográfica conocida como cristalografía de electrones y que se utiliza para observar elementos que forman cristales

muy pequeños y con organización bidimensional, también ha aportado datos interesantes que derivaron en uno de los primeros modelos estructurales de la PrP^{Sc}, la estructura en hélice-β (Govaerts, Wille et al. 2004). Finalmente, otro par de técnicas merecen también su mención por proporcionar información sobre limitaciones estructurales a nivel de residuo aminoacídico. La Resonancia paramagnética electrónica (del inglés, *Electron Paramagnetic Resonance*, EPR) utiliza elementos paramagnéticos unidos a determinados residuos de la proteína que ofrecen información sobre estructuras locales específicas así como de distancias intra e intermoleculares (Serag, Altenbach et al. 2002). Aplicada a PrP recombinante malplegada *in vitro*, la EPR mostró una disposición en hoja-β en registro paralela similar a las fibras amiloideas clásicas, pero la ausencia de infectividad de la PrP malplegada *in vitro* pone en duda la utilidad de dichos datos para la resolución de la estructura de los priones infecciosos (Cobb, Sonnichsen et al. 2007). La técnica de intercambio de hidrógeno-deuterio acoplada a la espectrometría de masas (del inglés *Mass-Spectrometry*, MS) o a RMN también informa de las limitaciones estructurales específicas de residuo mediante la medida del grado de accesibilidad de las regiones de la proteína a hidrógenos provenientes del agua, los cuales se intercambian por los deuterios que provienen del agua deuterada. Recientemente, aplicando esta tecnología a priones aislados de cerebro, se ha observado que tienen un núcleo altamente inaccesible al agua compuesto principalmente por hoja-β y pequeños lazos que van desde el residuo 90 aproximadamente hasta el carboxilo terminal. Además, se ha visto que las diferentes cepas de priones muestran diferencias sutiles en la región comprendida entre los residuos 90 y 140 aproximadamente, apuntando a que diferencias conformacionales específicas podrían ser responsables de las diferentes características de las cepas priónicas (Smirnovas, Baron et al. 2011).

Todos estos datos obtenidos a partir de técnicas de baja resolución, han dado lugar a diversos modelos estructurales propuestos durante las últimas décadas. Como muestra, se discutirán algunos de los modelos más relevantes como el de hélice-β, el de espiral-β o el de hoja-β en registro cuyas representaciones pueden verse en la figura 6.

Hélice-β

Este modelo está basado en los datos obtenidos por microscopía electrónica (ME) en cristales bidimensionales que encajaban muy bien con una estructura en forma de hélice-β levógira. Se trata de uno de los modelos más populares, construido encajando la secuencia de la PrP sobre un motivo hélice-β conocido. La unidad simétrica básica de la PrP^{Sc} estaría constituida por trímeros donde los residuos amino terminales de la PrP²⁷⁻³⁰ (aminoácidos de 90 a 175 aproximadamente) forman hélices-β levóginas apiladas horizontalmente con lazos sin estructura

definida, compuestos por los residuos de 145 a 163 y en los que los agregados mayores se forman apilando trímeros de PrP verticalmente a lo largo del eje de la hélice. Además de un nuevo plegamiento casi completo del extremo amino terminal, el modelo se caracteriza por cambios estructurales menores en el extremo carboxilo terminal, donde se sigue conservando en gran parte la estructura secundaria nativa salvo por la primera hélice- α que cambia a un lazo (Govaerts, Wille et al. 2004). El modelo viene respaldado por la observación de que otras proteínas con motivos β -helicoidales presentan ciertas propiedades bioquímicas similares a la PrP como la resistencia parcial a la degradación por proteasas y la propensión a agregar ((Schuler, Rachel et al. 1999), (Junker, Schuster et al. 2006)). Además, un prion de levadura cuya estructura ha podido ser resuelta mediante técnicas de alta resolución, HET-s, presenta una estructura denominada β -solenoides similar a la propuesta en este caso para la PrP^{Sc} (Wasmer, Lange et al. 2008).

Espiral- β

Este modelo se basa en simulaciones de dinámica molecular de las fluctuaciones conformacionales de la PrP en condiciones amiloidogénicas (pH ácido), utilizando la estructura de la PrP^C como punto de partida. El modelo consiste en un núcleo espiral de hojas- β extendidas compuestas por 3 cortas láminas- β (residuos 116-119, 129-132 y 160-164) y una cuarta lámina aislada (residuos 135-140). Como en el caso del modelo anterior, la formación de láminas- β implica un gran cambio conformacional de todo el extremo amino terminal mientras que el extremo carboxilo terminal se mantiene prácticamente intacto conservando incluso las 3 hélices- α características de la PrP^C. El principal respaldo de este modelo es que concuerda con la mayoría de observaciones obtenidas mediante las técnicas de baja resolución, aunque no satisface del todo datos obtenidos mediante proteólisis e intercambio de hidrógeno-deuterio (DeMarco and Daggett 2004).

Hoja- β paralela en registro

Este modelo propone una estructura para la PrP^{Sc} radicalmente distinta a los anteriores, donde la PrP se presenta como una pila de hojas- β paralelas que se disponen en registro, lo que permite un crecimiento infinito de las fibrillas. El modelo se basa principalmente en datos obtenidos mediante intercambio de hidrógeno-deuterio acoplado a MS en fibrillas de PrP recombinante (Cobb, Sonnichsen et al. 2007), así como en PrP^{Sc} derivada de encéfalo,

particularmente PrP²⁷⁻³⁰ aislado de ratones transgénicos que expresan PrP sin GPI para evitar interferencias debidas a los cambios post-traduccionales (Smirnovas, Baron et al. 2011). Al contrario que en los modelos anteriores, las PrPs que conforman esta estructura consisten en láminas-β y giros y/o lazos relativamente cortos entre ellas, sin hélices-α presentes, lo que indica que la conversión a PrP^{Sc} implica un nuevo plegamiento completo de la PrP^C sin conservación de ninguno de sus motivos estructurales.

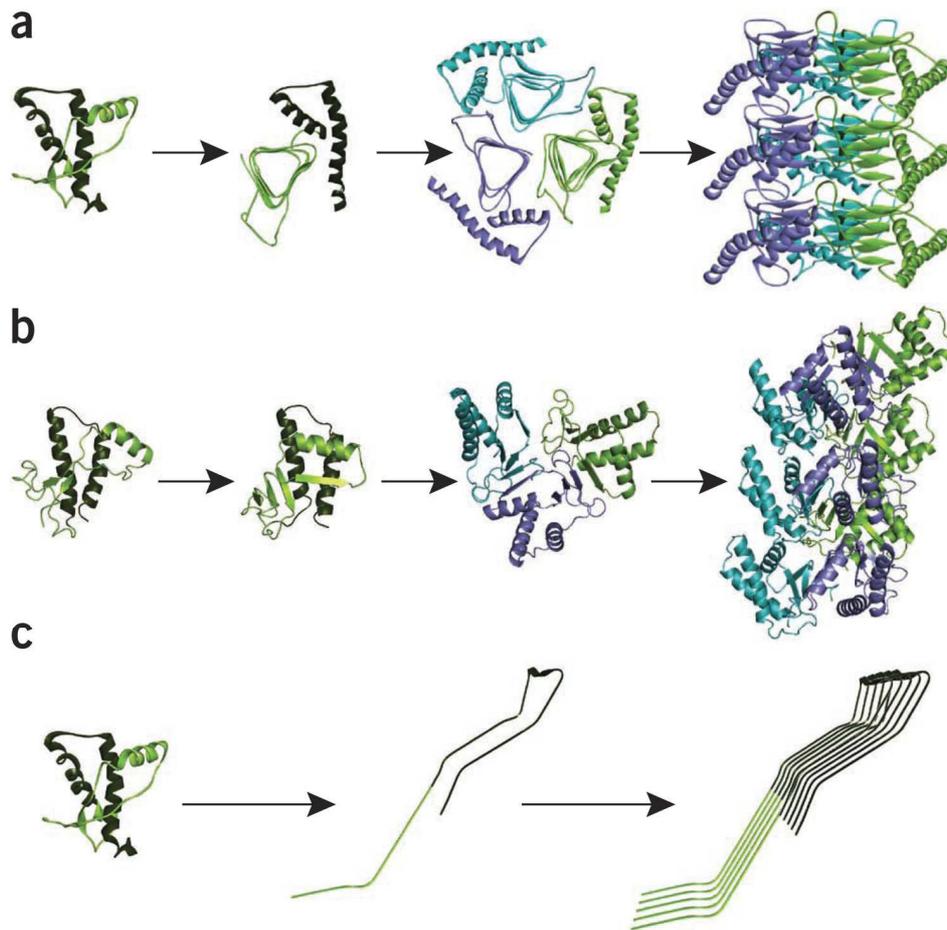


Figura 6. Representación gráfica de distintos modelos de estructura molecular de los agregados de PrP^{Sc}. A) Modelo β-helicoidal en que la región N-terminal de la PrP^C sufre un gran cambio conformacional durante la conversión hacia un motivo conocido como hélice-β entre los residuos 90 y 177. La región C-terminal conserva en cambio la organización y estructura α-helicoidal propia de la PrP^C. B) Modelo conocido como espiral-β que consiste en un núcleo en espiral de hojas extendidas formadas por hebras-β cortas que abarcan los residuos 116-119, 129-132, 135-140 y 160-164 y en el que las 3 α-hélices características de la PrP^C están altamente conservadas. C) Modelo de hoja-β paralela en registro que propone un desplegamiento y re-plegamiento completo de la PrP^C a una estructura compuesta mayoritariamente por hoja-β. Para facilitar la comparación se ha mantenido la asignación de colores a los distintos motivos estructurales en los 3 modelos (De (Diaz-Espinoza and Soto 2012)).

Actualmente es imposible determinar cuál de estos modelos se acerca más a la verdadera estructura de la PrP^{Sc}, aunque si algo puede concluirse de modelos tan dispares, es lo poco que se sabe aún sobre los detalles estructurales de la PrP^{Sc}. De hecho, los modelos anteriores son sólo una muestra de las posibles estructuras propuestas para la PrP^{Sc}, puesto que estudios basados en diferentes técnicas biofísicas y nuevas aproximaciones, dan lugar a una gran diversidad de información que trata de encajarse en modelos igualmente dispares. Un reciente ejemplo es el estudio de la estructura de la PrP^{Sc} mediante proteólisis limitada con PK y caracterización de los fragmentos de digestión con anticuerpos y espectrometría de masas. Así, han sido identificadas las regiones más accesibles y flexibles que unen las hojas beta de la PrP^{Sc}. Junto con las últimas interpretaciones de los datos obtenidos por espectroscopía, que sugieren que la estructura secundaria de la PrP^{Sc} está compuesta casi en su totalidad por hojas-β, giros y lazos (Cobb, Sonnichsen et al. 2007) y las evidencias obtenidas por difracción de rayos X de las fibras (Wille, Bian et al. 2009), que indican una organización de las hojas-β en forma de un solenoide de 4 peldaños, han llevado a la propuesta de un nuevo modelo β-solenoide. En este caso, cada peldaño junto con los lazos o giros que la unen al peldaño siguiente, constaría de unos 36-37 aminoácidos, que pueden ser asignados gracias a la identificación de los lazos realizada mediante proteólisis limitada con PK, resultando en el modelo que se muestra en la figura 7 (Silva, Vazquez-Fernandez et al. 2015).

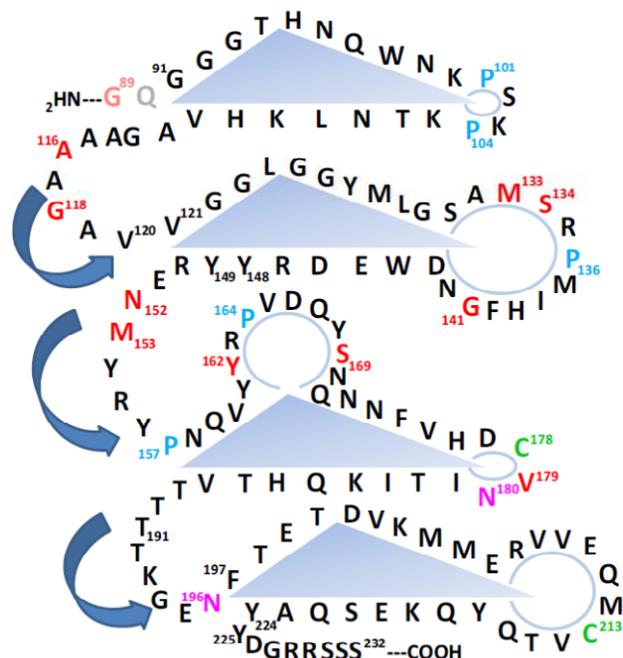


Figura 7. Modelo cualitativo de la estructura β-solenoide para la PrP^{Sc}. Los residuos aminoácidos se han distribuido en los 4 peldaños del solenoide conforme a los datos obtenidos por difracción de rayos X y por

proteólisis limitada con PK de una PrP^{Sc} murina sin GPI. Las Prolinas (azul) y los residuos en los que se da el corte de la PK (rojo) deben ocupar giros y lazos forzosamente. También se señalan los residuos del extremo amino terminal en colores degradados para indicar su irregularidad. Las Cisteínas (verde) que forman el puente disulfuro y los residuos donde puede darse la glicosilación (rosa) están también señalados. Los lazos que conectan los peldaños entre sí se indican con la flecha azul, mientras que los giros en un mismo peldaño están indicados por los círculos abiertos (De (Silva, Vazquez-Fernandez et al. 2015)).

Uno de los puntos más discutidos y en que más disienten los diferentes modelos es en si realmente se da una reestructuración completa del extremo carboxilo terminal globular. La reestructuración completa que propone el modelo de hoja- β paralela en registro es la que mejor concuerda con los datos obtenidos de los estudios de proteólisis limitada, puesto que es difícil de entender la elevada resistencia a la digestión por proteasas del carboxilo terminal de la PrP^{Sc} sin un cambio completo de la estructura respecto a la altamente sensible a proteasas PrP^C. De hecho, en los dos primeros modelos descritos, proponen que las hélices- α del extremo carboxilo terminal encaran el exterior de la fibra, por lo que deberían ser fácilmente accesibles a proteasas (Diaz-Espinoza and Soto 2012). No obstante, el modelo de hoja- β paralela en registro entra también en conflicto con los datos obtenidos por CD y FTIR que indican que la PrP^{Sc} contiene un porcentaje importante de hélice- α . Aunque estos datos experimentales son de difícil interpretación y las hélices- α detectadas podrían ser un artefacto, hecho respaldado por recientes observaciones para PrP^{Sc} y PrP^{Sc} sin GPI por FTIR que ponen en duda la existencia de las hélices- α descritas previamente (Baron, Hughson et al. 2011). Así pues, queda patente que aún queda un largo camino que recorrer para llegar al conocimiento detallado de la estructura de la PrP^{Sc} y más aun teniendo en cuenta que aunque la mayoría de PrP^{Sc} purificada aparece en forma de fibras amiloideas, se conocen priones altamente infecciosos que no adquieren estructuras fibrilares ((McKinley and Prusiner 1991), (Silveira, Raymond et al. 2005), (Wille, Bian et al. 2009)). Así que, a pesar de la importancia de resolver la estructura de agregados amiloideos de PrP altamente infecciosos, es probable que conocer las estructuras de PrP^{Sc} no amiloideo o precursor de las fibras sea también de vital importancia (Kraus, Groveman et al. 2013).

2.3.1. Neurotoxicidad

El hecho de que existan priones altamente infecciosos tanto en forma de agregados amiloideos como en ausencia de estas ultraestructuras fibrilares, conduce a otra de las grandes incógnitas que están por resolver en el campo de las EETs, la identificación de las formas neurotóxicas y los mecanismos por los que causan dicha toxicidad que lleva a la neurodegeneración. Con la generación de los primeros modelos de ratón transgénico sin PrP^C se descartó rápidamente que la ausencia de PrP^C o

una pérdida de su función debida a la conversión a PrP^{Sc} fuesen la causa de la neurodegeneración, dado que los ratones se desarrollaban normalmente (Bueler, Fischer et al. 1992). A su vez, modelos similares en los que la expresión de PrP puede ser suprimida de forma condicional demostraron que la eliminación de PrP^C en animales con infección priónica establecida revertía la degeneración espongiiforme en sus fases iniciales, previniendo la pérdida neuronal y la progresión de la enfermedad, a pesar de que la acumulación de agregados de PrP^{Sc} extracelulares era comparable a los controles de fenotipo salvaje en estadios terminales de la enfermedad ((Mallucci, Dickinson et al. 2003), (Mallucci, White et al. 2007)). Por tanto, queda claro que la toxicidad no viene causada directamente por la PrP^{Sc} sino que su neurotoxicidad parece estar mediada a través de la PrP^C, como demuestran bien los experimentos de injertos neurales que expresan PrP^C realizados en animales que no la expresan, puesto que sólo el injerto muestra neurodegeneración al ser infectado con priones (Brandner, Isenmann et al. 1996). En la misma línea, los estudios realizados con modelos animales que expresan la PrP sin GPI, en los que la acumulación de PrP^{Sc} es notable mientras que la neurodegeneración es mínima, respaldan la idea de que la PrP^C no sólo debe estar presente sino además debe estar anclada a la membrana (Chesebro, Trifilo et al. 2005). Además, como ya se ha mencionado previamente, también la detección de enfermedades priónicas con su característica neurodegeneración pero con niveles mínimos de agregados de PrP^{Sc}, tanto en humanos (Collinge, Owen et al. 1990) como en modelos animales (Hsiao, Cass et al. 1991), demuestra una disociación entre los agregados amiloideos de PrP^{Sc} y la toxicidad, apuntando a que podría ser alguna forma intermedia que se genera durante la conversión de PrP^C a PrP^{Sc} la que indirectamente causa degeneración a través de su interacción con la PrP^C.

El descubrimiento de diversas formas oligoméricas intermedias en la vía de formación de PrP^C a PrP^{Sc} (Baskakov, Legname et al. 2002), algunas de ellas con propiedades neurotóxicas en neuronas en cultivo (Kazlauskaitė, Young et al. 2005), ha contribuido también a redirigir la atención hacia PrPs oligoméricas solubles, que ya han sido señaladas como las formas más infecciosas (Silveira, Raymond et al. 2005). La toxicidad de especies oligoméricas de PrP se demostró también utilizando oligómeros y formas fibrilares de la PrP preparadas *in vitro*, que al inocularse en modelos animales y en cultivos neuronales mostraron una neurotoxicidad significativamente mayor que la de las formas fibrilares (Simoneau, Rezaei et al. 2007). Aun así, sigue sin saberse cómo interaccionan entre sí la PrP^C y los oligómeros de PrP^{Sc} o qué vías metabólicas se disparan debido a dicha interacción que conducen a la muerte de las neuronas. Descubrimientos recientes en otras enfermedades neurodegenerativas relacionadas con malplegamiento de proteínas como la enfermedad de Alzheimer o Parkinson, en las que especies oligoméricas precursoras de fibras amiloideas han sido también identificadas como las

formas más neurotóxicas ((Walsh, Klyubin et al. 2002), (Danzer and McLean 2011)), han centrado la atención en posibles mecanismos comunes de toxicidad, que resultan particularmente interesantes de entre la gran variedad de mecanismos propuestos para las enfermedades priónicas (revisado en (Aguzzi and Calella 2009)).

Uno de los mecanismos comunes más prometedores que relacionan el malplegamiento de proteínas con la pérdida neuronal, es que la toxicidad viene mediada por una alteración de la respuesta a proteínas malplegadas (del inglés, *Unfolded Protein Response*, UPR). Este es un mecanismo de protección que se dispara ante el aumento de proteínas malplegadas en el RE para hacer frente al estrés celular y mantener la homeostasis proteica, reduciendo la síntesis de proteínas temporalmente y aumentando la producción de chaperonas. La reducción de la síntesis proteica se da mediante el reconocimiento de proteínas malplegadas por la proteína BiP (del inglés, *Binding immunoglobulin Protein*) en el RE que activa la proteína PERK (del inglés, *Protein kinase RNA-like ER kinase*) que se autofosforila y fosforila a su vez la proteína eIF2 α (del inglés, *Eukaryotic translation initiation factor 2 α*), resultando en una reducción de la traducción proteica además de inducir la traducción de chaperonas y la síntesis de lípidos para aumentar la capacidad del RE. Normalmente, la UPR es temporal y la eIF2 α es rápidamente defosforilada, lo cual no sucede en los modelos de enfermedad priónica estudiados, ni en enfermos de Alzheimer o Parkinson, conduciendo a una sostenida inhibición de la expresión de proteínas sinápticas que acaba en neurodegeneración. La inhibición farmacológica de la UPR sostenida en ratones infectados por priones ha demostrado una protección neuronal extensa en el hipocampo, donde no hay apenas pérdida neuronal ni cambios espongiiformes (Halliday and Mallucci 2014). Sin embargo, a pesar de este y otros avances prometedores hacia una mayor comprensión de los mecanismos moleculares causantes de la neurodegeneración, aún queda mucho por entender acerca de los complejos y probablemente diversos fenómenos que ocurren en el curso de las patologías priónicas.

2.3.2. Rutas de adquisición y dispersión

También cabe destacar otros aspectos de vital importancia en el caso de las enfermedades priónicas de origen infeccioso y que tampoco se conocen en detalle, que son las posibles rutas de adquisición de priones desde el medio y cómo alcanzan el sistema nervioso central (SNC). Aunque la forma más rápida y eficiente para inducir la enfermedad priónica en modelos experimentales es la inoculación intracerebral con homogenizados de encéfalo de animales infectados (revisado por (Aguzzi and Calella 2009)), es evidente que no sucede lo mismo en las infecciones que se dan de forma natural. En el medio ambiente, la adquisición de priones podría darse por diversas vías, algunas descubiertas en

modelos experimentales y condiciones de laboratorio, y otras observadas en enfermedades transmitidas de forma natural.

La vía oral de adquisición de priones es una de las formas más conocidas de transmisión, tanto en condiciones experimentales (Fox, Jewell et al. 2006) como en enfermedades que han adquirido tintes epidémicos por consumo de tejidos infectados como en el caso del Kuru (Collinge, Whitfield et al. 2006), la EEB (Anderson, Donnelly et al. 1996) o la vECJ (Hilton 2006). En el caso de la ingestión de priones, se sabe que éstos se adsorben en la mucosa del intestino y las placas de Peyer, nódulos linfáticos que recubren interiormente la mucosa del intestino, desde donde son transferidos a la superficie de las células dendríticas foliculares del tejido linfático que los transportan hasta los nervios entéricos donde acaban invadiendo el SNC ((Aguzzi, Heikenwalder et al. 2007), (Wathne and Mabbott 2012)).

Para otras rutas de adquisición, como pueden ser mediante inyección en la lengua, parece que la invasión del SNC se da directamente a través de los nervios craneales (Bartz, Kincaid et al. 2003), mientras que para otras vías que se han probado efectivas en animales de experimentación como las inyecciones intravenosas o intraperitoneales, el sistema linforeticular está claramente implicado como en el caso de la adquisición oral. Se conoce desde hace mucho que tanto el bazo (Fraser and Dickinson 1970) como los nódulos linfáticos (Pattison and Millson 1962) de animales infectados son infecciosos y a partir de esos primeros descubrimientos una gran cantidad de estudios han desvelado la participación de diversas células del sistema inmunológico en la patogénesis periférica de las EETs. Particularmente, se detectaron niveles de expresión moderados de PrP^C en linfocitos circulantes (Cashman, Loertscher et al. 1990) y poco después se demostró que la ausencia de dichos linfocitos impedía la adquisición de priones por vía periférica, mientras que no tenía ningún efecto si los priones eran directamente inyectados en el SNC (Kitamoto, Muramoto et al. 1991). El mismo estudio determinó también que es en las células dendríticas foliculares donde se acumula la PrP^{Sc} en los nódulos linfáticos. Posteriormente se observó que los linfocitos circulantes no requerían de expresión de PrP^C para el desarrollo de la patología periférica, lo que sugiere que actúan como simples transportadores de PrP^{Sc} a los nódulos linfáticos, donde la propagación o acumulación de PrP^{Sc} parece ser dependiente de las células dendríticas foliculares (Aguzzi 2001). No obstante, experimentos con diferentes cepas de priones revelaron resultados contradictorios en este sentido, pues en algunos casos los linfocitos resultaron irrelevantes para la progresión de la patología periférica, indicando así que distintas cepas requieren diferentes tipos celulares para alcanzar el sistema linforeticular (Shlomchik, Radebold et al. 2001).

Así pues, aunque está claro que el sistema inmunológico forma una parte importante de la patología periférica de las EETs, aún queda por aclarar qué células son responsables de dicha propagación periférica. La participación del sistema inmunológico va más allá en la patología periférica de las enfermedades priónicas, puesto que una infección exitosa requiere la capacidad de evadirlo, lo que no se sabe cómo sucede en el caso de los priones. Probablemente, la respuesta inmunológica está restringida por el hecho de ser una proteína que se expresa también de forma endógena aunque malplegada y posiblemente también porque los epítomos conformacionales deben ser de difícil acceso debido al empaquetamiento y las grandes glicosilaciones de los multímeros de PrP^{Sc} (Kraus, Groveman et al. 2013). No obstante, una vez los priones alcanzan el SNC, se da una notable activación de la microglía cuya ablación farmacológica produce un incremento significativo de PrP^{Sc} (Heppner, Arrighi et al. 2001). El proceso de transporte de los priones infecciosos del sistema linforetico, generalmente desde el bazo hasta el SNC, sería la segunda fase del proceso de neuroinvasión y se cree que se da a través de los nervios periféricos. Concretamente, la inervación de los órganos linfáticos es principalmente simpático (Felten, Felten et al. 1985) y diversos estudios han sugerido que es por esta vía por la que la PrP^{Sc} alcanza el SNC, destacando que diversas formas de simpatectomía producen un significativo retraso de la neuroinvasión y por tanto, de las enfermedades priónicas (revisado en (Aguzzi and Calella 2009)). El mecanismo por el que la PrP^{Sc} pasa del sistema linforetico al sistema nervioso sigue sin conocerse en detalle, aunque se ha señalado el posible papel de las células dendríticas foliculares en ello, puesto que la reducción de la distancia entre estas células y las terminaciones nerviosas que inervan los órganos linfáticos resulta en un aumento de la entrada de priones al SNC (Prinz, Heikenwalder et al. 2003). Hay tres hipótesis que proponen diferentes vías por las que los priones podrían alcanzar las neuronas desde el sistema linforetico, i) mediante contacto célula-célula, ii) mediante transporte vesicular o iii) bien, a través de priones que flotan libremente en el medio extracelular. Hay evidencias *in vitro* que respaldan las tres hipótesis, descartando así un posible rol exclusivo de alguna de las tres vías y por tanto, podría ocurrir que las tres formas de neuroinvasión tengan su papel *in vivo* (revisado por (Aguzzi and Calella 2009)).

Cualquiera que sea la forma en la que los priones alcanzan el sistema nervioso periférico y aunque se sabe que el nivel de expresión de PrP modula el transporte intranervioso, aún no se conoce en detalle cómo son transportados los priones en los nervios periféricos (Glatzel and Aguzzi 2000). De acuerdo con la hipótesis de “sólo proteína”, se podría suponer un mecanismo donde la PrP^{Sc} infiltrada desde el tejido linforetico iría malplegando la PrP^C residente en la superficie de las células del sistema nervioso, propagándose secuencialmente hasta llegar al SNC. Aunque puramente especulativo, este modelo

encaja bien con la extremadamente lenta velocidad de propagación neuronal de los priones (Kimberlin, Field et al. 1983). Sin embargo, mecanismos de transporte axonal y no axonal podrían estar implicados, así como otras células del sistema nervioso como las células de Schwann (revisado en (Aguzzi and Calella 2009)). La mayor parte de las evidencias a favor de un transporte axonal, en el que la PrP^{Sc} sería recogida en las terminaciones de los nervios periféricos y transportado de forma retrógrada al SNC por algún mecanismo posiblemente asociado a microtúbulos, provienen de estudios realizados por inoculación intraocular, por donde se accede directamente al sistema nervioso periférico (Fraser 1982). La adquisición de enfermedades priónicas humanas iatrogénicas debidas a trasplantes de córnea también respaldan la existencia de un mecanismo de transporte axonal, de forma retrógrada del cerebro a la córnea y de forma anterógrada desde la córnea al SNC (Maddox, Belay et al. 2008). No obstante, los posibles mecanismos de transporte de priones dentro del SNC siguen sin aclararse dada la dificultad para su estudio, pudiéndose volver aún más complicado si cada una de las diferentes cepas de priones utilizan distintas vías de propagación tal y como se sospecha (Bartz, Dejoia et al. 2005).

Finalmente, e independientemente de cómo tenga lugar la neuroinvasión, el ciclo vuelve a empezar cuando los priones son liberados al medio natural por un animal infectado por mecanismos igualmente desconocidos. Así, por ejemplo para la EDC de cérvidos, que es uno de los mejores ejemplos de transmisibilidad *in vivo* por su carácter epidémico, se ha reportado infectividad en piel, heces, orina, leche, secreciones nasales, saliva y placenta de animales infectados vivos y por supuesto, en los cadáveres de animales ((Gough and Maddison 2010), (Haley, Mathiason et al. 2011), (Tamguney, Richt et al. 2012)). Teniendo en cuenta la elevada resistencia de los priones a gran variedad de agentes que inactivan otros patógenos, no es difícil suponer que los priones que se liberan de animales infectados persisten en el medio durante largos periodos de tiempo, de donde son adquiridos por animales sanos (Kraus, Groveman et al. 2013).

2.3.3. Fenómeno de cepas

Uno de los fenómenos más misteriosos de la biología de los priones es la existencia de distintas cepas. Este fenómeno es uno de los que más ha hecho cuestionar la hipótesis de “sólo proteína”, dado que una misma secuencia de aminoácidos puede dar lugar a distintas cepas de priones capaces de generar distintos fenotipos de enfermedades priónicas cuando son transmitidas a un mismo hospedador. Estas características fenotípicas no sólo son evidentes en cuanto a la sintomatología, sino también en relación al patrón de depósitos de proteína agregada, periodo de incubación, perfil de lesión histopatológica y áreas de dianas neuronales específicas (Bruce and Fraser 1991). El periodo de

incubación de la enfermedad y el perfil de lesiones se utilizan para la identificación y su clasificación mayoritariamente (Bruce 2003).

La especificidad de las cepas, de acuerdo con la hipótesis de “sólo proteína”, vendría determinada por la estructura terciaria y/o cuaternaria de la proteína priónica, como indicaron los estudios realizados al respecto con dos cepas claramente distinguibles que pueden propagarse en hámsteres, Hyper (HY) y Drowsy (DY). Además de observarse dos fenotipos completamente diferentes en cuanto a la manifestación de la enfermedad, durante la purificación de la PrP^{Sc}, también se observaron ciertas diferencias en las propiedades fisicoquímicas de los priones causantes de una u otra sintomatología en cuanto a las velocidades de sedimentación y resistencia al tratamiento con agentes desnaturalizantes (Bessen and Marsh 1992). Así mismo, también se observó que tras haber tratado las muestras extraídas con PK, se generaban dos núcleos resistentes de diferentes tamaños de acuerdo con su distinta movilidad electroforética (Bessen and Marsh 1994). Al no hallarse ninguna otra diferencia, se concluyó que este procesamiento distintivo de dos proteínas con idéntica secuencia primaria de aminoácidos podía explicarse como consecuencia de diferencias estructurales, de modo que el plegamiento diferencial permite que se expongan residuos aminoacídicos que de otra forma serían inaccesibles a la PK. De todas formas, dado el desconocimiento acerca de la estructura cuaternaria de la PrP^{Sc}, resulta imposible corroborarlo a día de hoy, así como determinar en qué consisten dichas diferencias estructurales y cómo dictan las diferencias fenotípicas descritas.

Otro rasgo característico y específico de cada cepa priónica es que presentan proporciones distintivas de PrP diglicosilada, monoglicosilada y no glicosilada que se mantienen además estables durante múltiples pases de inoculación seriados en modelos animales ((Collinge, Sidle et al. 1996), (Race, Meade-White et al. 2002)) e *in vitro* (Castilla, Morales et al. 2008). Esto sugiere que las cepas de prion podrían estar codificadas en una combinación basada no sólo en la conformación de la PrP, sino también en su patrón de glicosilación. Sin embargo, el descubrimiento de priones que no presentan este patrón de tres bandas tras la digestión con PK ha hecho que se distingan dos grandes grupos de cepas priónicas. Por un lado, las clásicas, que presentan el patrón de tres bandas con diferentes proporciones según la cepa; y por otro lado las atípicas, que además de poder presentar las tres bandas aunque generalmente mal definidas, se caracterizan por presentar fragmentos internos de la PrP resistentes a PK y escindidos de los extremos amino y carboxilo de entre 6 y 8 kDa según la cepa de prion. Se han identificado cepas de priones atípicas en humanos con GSS ((Parchi, Chen et al. 1998), (Tagliavini, Lievens et al. 2001)) o con una enfermedad priónica de reciente descubrimiento y que se ha

denominado VPSPr) (Gambetti, Dong et al. 2008). Por último, también en pequeños rumiantes con scrapie se ha descrito una cepa atípica denominada Nor98 (Pirisinu, Nonno et al. 2013). Curiosamente, en el ganado bovino donde predomina la cepa clásica de EEB, se han detectado otras cepas que, aunque se han denominado como atípicas, presentan un patrón tribanda sólo distinguibles por su particular movilidad electroforética (Balkema-Buschmann, Fast et al. 2011).

Una de las características más sorprendentes de las cepas priónicas es que afectan a diferentes áreas del cerebro, mostrando dianas neuronales específicas que llevan a distintos signos clínicos y patrón de deposición de PrP^{Sc} en el cerebro. A pesar de que este fenómeno de tropismo celular se ha estudiado de forma intensiva en una gran variedad de líneas celulares capaces de propagar distintas cepas de priones, aún se desconoce qué es lo que define el tropismo de cada una (Mahal, Baker et al. 2007). Se ha postulado que el comportamiento de cepa podría estar definida por la estructura supramolecular del prion que influiría en su habilidad de unirse o interactuar con moléculas específicas, como por ejemplo distintos receptores celulares, y que por consiguiente, su capacidad de propagación sería dependiente de un tipo celular específico (revisado en (Aguzzi and Calella 2009)). Esta hipótesis implicaría que el tropismo celular de las distintas cepas de priones estaría controlado por la existencia de cofactores celulares específicos, ya sean chaperonas, receptores específicos de captación, especies de ARN, entorno lipídico particular, PrP modificadas post-traduccionalmente de forma específica o un entorno subcelular particular; basándose en la suposición de que los cofactores que sustentan la conversión de distintas cepas existen en tipos celulares definidos (Aguzzi, Heikenwalder et al. 2007). Otras teorías proponen en cambio que, como el proceso de glicosilación difiere en distintos tipos celulares, el patrón de glicosilación de la PrP^{Sc} podría actuar como guía del mismo hacia una región determinada del SNC (Collinge, Sidle et al. 1996). Así, se postula que las glicofomas concretas de PrP^{Sc} podrían propagarse de forma más favorable en poblaciones neuronales que expresan una glicofoma similar de PrP^C en la superficie celular (Collinge 2001). No obstante, al igual que la mayoría de las cuestiones planteadas en este apartado para la PrP^{Sc}, parece que se requiere de la determinación previa de la estructura tridimensional del prion para una mayor comprensión de los mecanismos moleculares que rigen el fenómeno de cepa.

3. Barrera de transmisión

La capacidad de algunos priones para infectar individuos de otras especies diferentes a aquella de la que proceden se conoce casi desde el inicio del descubrimiento de las EETs, cuando Gajdusek y colaboradores pudieron inducir experimentalmente el Kuru en chimpancés (Gajdusek, Gibbs et al.

1966). Desde entonces, la transmisión interespecies de las enfermedades priónicas se ha observado en la naturaleza en algunas especies, como la transmisión de la EEB a seres humanos causando la variante de la ECJ (Weissmann and Aguzzi 1997) y ha sido investigada intensivamente en modelos animales, principalmente en ratones transgénicos que expresan PrP de otros mamíferos ((Scott, Foster et al. 1989), (Race, Priola et al. 1995), (Telling, Scott et al. 1995), (Castilla, Gutierrez Adan et al. 2003), (Castilla, Gutierrez-Adan et al. 2004), (Kong, Huang et al. 2005)), debido a su potencial zoonótico.

Sin embargo, la propagación de priones entre diferentes especies animales está restringida, al menos en parte, por un fenómeno denominado barrera de transmisión o barrera de especie, que se define como la dificultad que presentan algunas cepas de priones para transmitirse a una especie diferente de la que proceden y que se traduce en una prolongación del tiempo de incubación y/o una tasa de ataque incompleta, es decir, en que no todos los animales inoculados desarrollan la enfermedad (Dickinson 1976). Habitualmente ocurre que en una primera inoculación de un prion en animales de otra especie, no todos los individuos desarrollen la enfermedad y que los que la desarrollan lo hagan con periodos de incubación más largos y variables que los observados para la transmisión de priones entre animales de una misma especie. Estos tiempos de incubación se van reduciendo a lo largo de pases o inoculaciones sucesivas en la nueva especie hasta que finalmente se estabilizan, pudiendo cuantificarse en cierta manera el grado de barrera existente midiendo la reducción del tiempo de incubación que se da entre un primer y segundo pase. Sin embargo, una cuantificación más rigurosa requiere de estudios comparativos de titulación, en que animales de la especie donante y de la especie receptora son inoculados con diluciones seriadas del inóculo priónico comparándose la Dosis letal 50 (del inglés, *Lethal Dose 50%*, LD50) media de cada especie (Collinge 2001). No obstante, la cuantificación de una barrera es posible únicamente cuando ya se conoce su transmisibilidad, cuando lo realmente necesario sería un método de predicción del grado de barrera de transmisión existente entre una especie y otra para evaluar la posibilidad de nuevas epidemias de origen zoonótico. Una herramienta inexistente actualmente debido a que no se conoce en detalle qué determina el grado de la barrera de transmisión interespecies.

Se creía que dicha barrera podría deberse a un efecto acumulativo de factores tales como la eficiencia de conversión y la patología causada por la cepa seleccionada ((Kimberlin, Cole et al. 1987), (Kimberlin, Walker et al. 1989)). Sin embargo, parece ser que la causa principal de este fenómeno son las diferencias en la estructura primaria de la PrP que puede haber entre la especie donante y en la especie receptora ((Prusiner, Scott et al. 1990), (Scott, Foster et al. 1989), (Scott, Groth et al. 1993)). En

estos estudios iniciales se utilizaron ratones transgénicos que expresaban la PrP de hámster junto con la endógena de ratón, donde se demostró que al ser infectados con priones de ratón se producían casi exclusivamente agregados de PrP^{Sc} de ratón, mientras que al ser infectados con priones de hámster se formaban mayoritariamente agregados compuestos por PrP^{Sc} de hámster (Prusiner, Scott et al. 1990). La estrecha relación entre el grado de barrera de transmisión y las secuencias aminoacídicas de la PrP del donante y receptor de la infección ha quedado posteriormente corroborada por una gran variedad de estudios. Entre ellos, aquellos realizados en animales que expresan PrP de dos especies y que muestran un retraso en la aparición de signos clínicos frente a animales que expresan únicamente la PrP de secuencia idéntica al prion utilizado ((Browning, Mason et al. 2004), (Windl, Buchholz et al. 2005)) o aquellos experimentos realizados con animales que expresan PrP quiméricas, con la intención de localizar las regiones clave para la barrera ((Scott, Safar et al. 1997), (Kupfer, Eiden et al. 2007)). No obstante, la situación es más compleja ya que también se ha observado que cada cepa de prion muestra unas propiedades propagativas específicas en otras especies observándose que dos cepas distintas que contienen la misma secuencia de aminoácidos, su transmisibilidad puede variar ((Collinge, Palmer et al. 1995), (Hill, Desbruslais et al. 1997)). La importancia de la similitud de secuencias también está respaldada por los fenómenos de barrera de transmisión observados en una misma especie que presenta variantes polimórficas de PrP, siendo los ejemplos más conocidos de ello la diferente susceptibilidad de los ratones de genotipo a y genotipo b, cuyas PrPs difieren en dos residuos aminoacídicos y muestran tiempos de incubación muy dispares en función de la cepa priónica inoculada (Carlson, Goodman et al. 1988), o los diversos polimorfismos que aparecen en las PrP ovinas y que determinan su mayor o menor susceptibilidad a determinadas cepas de scrapie ((Laude, Vilette et al. 2002), (Truscott and Ferguson 2009)). No obstante, la relación entre similitud de secuencias primarias entre PrP^{Sc} y PrP^C y el grado de barrera de transmisión no es directa, ya que la sustitución de determinados residuos aminoacídicos puede tanto ejercer un efecto insignificante en la transmisibilidad, como llegar a prevenir la transmisión de la enfermedad o al menos su desarrollo en vida del animal infectado ((Priola and Chesebro 1995), (Hill, Joiner et al. 2000), (Barron, Thomson et al. 2001), (Vorberg, Groschup et al. 2003)). La detección de dichas regiones o residuos determinantes de la barrera de transmisión se ha tratado de llevar a cabo intensivamente en una gran variedad de modelos.

En modelos animales, los estudios más significativos se realizaron inicialmente mediante el estudio de la barrera de transmisión entre hámster y ratón, ya que al ver que la barrera de transmisión era mayor entre estas dos especies que entre especies más cercanas entre sí como diferentes especies de hámster, se sospechó que la barrera de transmisión dependía de las diferencias en las secuencias de PrP

(Lowenstein, Butler et al. 1990). Esto llevó a los estudios ya descritos en que ratones transgénicos coexpresan las PrP de hámster y ratón (Prusiner, Scott et al. 1990), y de ahí a generar animales transgénicos que expresan PrP quiméricas compuestas por diferentes partes de ambas proteínas, una con 5 de las 16 mutaciones que distinguen la PrP de hámster de la de ratón y la otra con sólo dos de las anteriores mutaciones. Al ser inoculados con priones de ratón o de hámster, se vio que los que más diferencias presentaban con la PrP de ratón eran más susceptibles a los priones de hámster, mientras que los que presentaban sólo dos sustituciones correspondientes al hámster se comportaban prácticamente como ratones de genotipo salvaje al ser inoculados con la misma cepa, mientras que con una cepa diferente mostraban mayor susceptibilidad (Scott, Groth et al. 1993). Así, se corroboró que pequeñas variaciones de la secuencia de la PrP podían alterar de forma drástica la susceptibilidad del hospedador, pero que además de la similitud de secuencias entre PrP^C y PrP^{Sc}, factores que determinan las distintas cepas también ejercen una gran influencia. Y más importante, que mediante la inoculación de los priones quiméricos, podía transmitirse la enfermedad priónica originaria de hámster a ratones y viceversa, demostrando que la superación de determinadas barreras de transmisión puede alterar las propiedades de la cepa priónica. Otra clara demostración de este fenómeno de adaptación y cambio de propiedades de una cepa al superar determinadas barreras de transmisión se realizó mediante inoculación y adaptación a través de tres inoculaciones seriadas de la EDC de cérvidos en hurones (*Mustela putorius*). La EDC no puede infectar hámsteres directamente, pero sí tras su adaptación al hurón (Bartz, Marsh et al. 1998). Los modelos *in vitro* y cultivos celulares han servido para afinar qué residuos o regiones son los más relevantes en determinadas barreras, dado que permiten evaluar diversas cepas sobre un gran número de diferentes PrPs de forma más rápida que lo que permite la experimentación *in vivo*. De esta forma, se utilizó por ejemplo el ensayo libre de células para estudiar en detalle la barrera de transmisión entre ratones y hámsteres la cual se había estudiado previamente *in vivo*. Los resultados mostraron que el grado de conversión *in vitro* se correlacionaba con lo visto *in vivo* y se refinaron las posiciones críticas involucradas en la barrera entre ratón y hámster a tres residuos aminoacídicos concretos (Kocisko, Priola et al. 1995).

Dado que la PMCA replica la propagación de priones que podría suceder *in vivo*, manteniendo las propiedades de cepa, resulta una herramienta muy útil para evaluar las barreras de transmisión (Fernandez-Borges, de Castro et al. 2009). Su correlación con lo que sucede *in vivo* ha sido demostrada en diversas ocasiones, como por ejemplo en el caso de las cepas generadas en PrP de cérvido a partir del mismo prion murino, denominado RML (del inglés *Rocky Mountain Laboratory*), mediante PMCA e *in vivo*, que muestran propiedades idénticas al ser inoculados en animales (Green, Castilla et al. 2008). Así,

la PMCA permite el uso de un gran número de diferentes cepas de priones sobre diversas PrP polimórficas y evaluar de esta forma las barreras de transmisión difíciles de evaluar *in vivo* (Fernandez-Borges, de Castro et al. 2009). Uno de los ejemplos más claros de la utilidad de la PMCA para evaluar y superar barreras de transmisión es el realizado con priones de ratón y hámster, dos de los modelos más utilizados para el estudio de las enfermedades priónicas. Mediante PMCA, se consiguió adaptar un prion de hámster a ratón en 2-3 semanas, lo que *in vivo* requirió al menos 3 o 4 pases seriados de inoculación, demostrando así que la PMCA permite cruzar las mismas barreras existentes *in vivo* con gran rapidez (Castilla, Gonzalez-Romero et al. 2008). No obstante, la relativa facilidad con la que la PMCA supera las barreras de transmisión *in vitro* la convierten en una de las mayores desventajas de la técnica. Este hecho se evidencia cuando algunas barreras que nunca se habían cruzado *in vivo*, ni siquiera utilizando animales transgénicos con sobreexpresión de PrP (Sigurdson, Manco et al. 2006) han sido superadas utilizando la PMCA. Estos problemas, se han solucionado al menos parcialmente, estableciendo parámetros controlados empíricamente respecto a un estándar en lo que se refiere a número de sonicaciones en cada ronda de PMCA y número de rondas seriadas de PMCA, evitando así la probable conversión de cualquier PrP de mamífero en PMCA siempre que se utilicen las semillas adecuadas y un suficiente número de rondas (Fernandez-Borges, de Castro et al. 2009).

Los modelos celulares ofrecen también una alternativa a los estudios *in vivo* y no cuentan con la, a veces excesiva, eficiencia de técnicas como la PMCA, aunque presentan otras desventajas. A pesar de que en los últimos 40 años se han desarrollado diversos modelos celulares, tanto de cultivos primarios como de líneas celulares establecidas, la mayoría solo son capaces de propagar un rango limitado de cepas priónicas generalmente de origen murino. Además, diferentes clones de una misma línea celular muestran diferente susceptibilidad a las mismas cepas priónicas, como es el caso de una de las líneas celulares más populares: las células derivadas de neuroblastoma de ratón denominadas N2a y sus subclones (revisado en (Fernandez-Borges, Erana et al. 2013)). A pesar del limitado rango de barreras que permiten estudiar, se han utilizado con éxito para el estudio de la barrera de transmisión entre ratones y hámsteres, afinando los residuos críticos en la barrera a regiones y aminoácidos concretos (Priola and Chesebro 1995). No obstante, algunas de las limitaciones mencionadas para los modelos celulares han ido resolviéndose desde 2001, como la restricción a priones de roedores mediante el desarrollo de nuevas líneas celulares no necesariamente provenientes de células del SNC, capaces de propagar una infección priónica mediante expresión de PrP^C de determinadas especies como la línea celular epitelial RK13, proveniente de epitelio renal de conejo (revisado en (Fernandez-Borges, Erana et al. 2013)). La utilidad de estos y otros muchos modelos *in vitro* e *in cellulo* de propagación priónica para

evaluar barreras de transmisión es evidente por su mayor simplicidad y rapidez, a pesar de no reproducir completamente aspectos importantes de las EETs como la neurotoxicidad, la compleja estructura cerebral o la gran variedad de células y componentes del SNC que podrían jugar un papel en la patología.

No obstante, el uso coordinado de todo tipo de modelos y técnicas disponibles es necesario para la determinación de un tema tan complejo como las barreras de transmisión interespecies, como ejemplifica la identificación de regiones de la PrP que podrían tener gran relevancia para un elevado número de especies y cepas como el denominado lazo rígido que separa la segunda hélice- α de la segunda lámina- β . A pesar de que las secuencias primarias y las estructuras tridimensionales de la proteína PrP determinadas por RMN están muy conservadas entre los distintos mamíferos (Wopfner, Weidenhofer et al. 1999), el lazo rígido α 2- β 2 muestra una alta diversidad de secuencia y constituye una característica exclusiva de cérvidos (Gossert, Bonjour et al. 2005), equinos (Perez, Damberger et al. 2010) y lepóridos (Vorberg, Groschup et al. 2003) y puede ser una clave en la barrera interespecies (Billeter, Riek et al. 1997). De hecho, las dos sustituciones (S170N y N177T) que son responsables de la rigidez del lazo en cérvidos (Gossert, Bonjour et al. 2005), modulan su susceptibilidad frente diferentes cepas de prion y los ratones que expresan el lazo rígido (TgMoPrP170,174), muestran una barrera de transmisión para cepas murinas con tiempos de incubación muy largos ((Sigurdson, Nilsson et al. 2010), (Kyle, John et al. 2013)), mientras que la cepa de cérvido EDC fue capaz de infectar este modelo animal mostrando tiempos de incubación muy cortos (Sigurdson, Nilsson et al. 2010). Mediante PMCA, se han replicado los estudios realizados *in vivo* con gran rapidez y se ha estudiado qué residuos de esta zona participan más activamente en la barrera, permitiendo entre otros, el desarrollo de modelos moleculares que podrían explicar y por tanto, predecir *in silico* las barreras de transmisión interespecies (Kurt, Jiang et al. 2014).

Por último, cabe destacar que además de la secuencia primaria de la PrP y su estructura tridimensional se ha sugerido la contribución de otros componentes en la barrera de transmisión, como cofactores de interacción que intervienen en la eficiencia de la propagación, aunque todavía no hayan sido caracterizados (Deleault, Kascsak et al. 2010).

3.1. Especies resistentes a enfermedades priónicas

Un aspecto particularmente interesante derivado de los experimentos de transmisión, es el desarrollo del concepto de especies resistentes a las enfermedades priónicas. En el estudio de cualquier

enfermedad infecciosa se aspira a encontrar individuos resistentes a la misma dada su incalculable utilidad en el desarrollo de terapias y como tal, las enfermedades priónicas, mortales y sin tratamiento posible, no son una excepción. Como se ha mencionado anteriormente, desde la descripción inicial de la tembladera de las ovejas, la lista de EETs y animales susceptibles a esta familia de este tipo de enfermedades ha ido aumentando. Sin embargo, al mismo tiempo se han ido describiendo especies aparentemente resistentes a EETs, es decir, animales en los que no se ha descrito la enfermedad a pesar de compartir nichos ecológicos con especies que las padecen, como es el caso de conejos y ovejas (Fernandez-Borges, Chianini et al. 2012). El caso de los conejos es particularmente interesante, puesto que el hecho de utilizarse como animal de experimentación también ayudó a la consideración de los lepóridos como especies resistentes a las enfermedades priónicas. Ya desde antes de que se tuviera idea de la naturaleza del agente infeccioso, se realizaron diversos intentos de inoculaciones experimentales de conejos con la cepa de scrapie adaptada a ratón ME7 sin ningún éxito aunque esta misma cepa resulta fácilmente transmisible a ovejas, ratones, hámsteres y topillos rojos (*Microtus agrestis*) (Barlow and Rennie 1976). Así mismo, inoculaciones con otras cepas como ECJ o Kuru tampoco consiguieron inducir la enfermedad (Gibbs and Gajdusek 1973), indicando la posibilidad de que los conejos fueran resistentes a las enfermedades priónicas independientemente de la cepa utilizada. La epidemia de EEB acaecida en Europa contribuyó en gran medida a mantener el concepto de especies resistentes a EETs frente al de virulencia dependiente de cepa. A esto contribuyó la existencia de informes de infección por EEB de diversos animales exóticos en zoológicos pero ausencia de EETs en otros animales igualmente expuestos a los mismos contaminantes (Fernandez-Borges, Chianini et al. 2012). La elevada susceptibilidad de algunas especies frente a la aparente resistencia de otras filogenéticamente cercanas y con tiempos de vida media similares, llevó a la consideración de que equinos, cánidos y lepóridos podrían ser resistentes a las enfermedades priónicas, pues no adquirirían EEB a pesar de haber sido expuestos a los mismos piensos contaminados ((Kirkwood and Cunningham 1994), (Sigurdson and Miller 2003)). Desde entonces, los conejos han sido principalmente estudiados como modelo experimental de animal resistente, habiendo menos datos sobre cánidos y equinos por las dificultades de uso como animal de experimentación (Fernandez-Funez, Zhang et al. 2011).

No obstante, el concepto de especies resistentes a enfermedades priónicas debe manejarse con extrema cautela, ya que el hecho de no haber casos naturales descritos, ni infecciones experimentales exitosas, puede ser insuficiente para la clasificación de una especie como resistente. Las generalizaciones sobre la susceptibilidad o resistencia de una determinada especie a infecciones priónicas son prácticamente imposibles dado que podría haber tantas enfermedades priónicas

diferentes como cepas identificadas. Ya se ha visto que diferentes cepas de EET pueden afectar a diferentes especies y tejidos, con diferentes tiempos de incubación y manifestaciones clínicas, por lo que predecir si una cepa podría transmitirse o no a otra especie resulta imposible. Además, los fenómenos de adaptación que pueden padecer determinadas cepas priónicas al infectar nuevas especies hacen aún más arriesgado clasificar determinadas especies como resistentes a priones, puesto que podría ser que simplemente no se hubiese dado con la cepa adecuada (Chianini, Fernández-Borges et al. 2013). También la ruta de infección juega un importante papel en la transmisibilidad de las EETs así como la capacidad específica de cepa de replicar de forma extraneural (Beringue, Herzog et al. 2012), siendo habitualmente responsable de la virulencia que presenta cada cepa en una determinada especie. Un ejemplo de transmisibilidad excepcional es el caso del scrapie, que a pesar de haber demostrado una gran virulencia en ganado ovino y caprino durante siglos, nunca se ha visto transmisión natural a otras especies, hasta el punto de que se considera no virulento para humanos (Chianini, Fernández-Borges et al. 2013). Sin embargo, resulta imposible predecir su habilidad para adaptarse a otras especies y descartar fenómenos como el observado para la EEB, que cuando es transmitido a oveja se vuelve más virulento para el ganado bovino y adquiere además un rango de hospedador más amplio (Padilla, Beringue et al. 2011).

También los nuevos métodos *in vitro* desarrollados para la propagación de priones, han demostrado la necesidad de extrema cautela a la hora de clasificar especies como resistentes a infecciones priónicas. El ejemplo más claro de ello es el estudio realizado por Chianini y colaboradores que demuestra que los conejos no son resistentes a enfermedades priónicas. En este estudio, mediante la técnica de PMCA se consiguieron propagar priones de diversos orígenes en homogenizado de encéfalo de conejo, que posteriormente causaron enfermedad priónica en conejos al ser inoculados intracerebralmente. La supuesta resistencia a las enfermedades priónicas que se les adjudicó durante décadas, pudo refutarse gracias a la capacidad de la PMCA para superar barreras de transmisión. Aun así, los tiempos de incubación resultaron muy prolongados respecto a otras especies, impidiendo el cálculo de la tasa real de infección, que es aparentemente baja posiblemente debido a que el tiempo de incubación excede el de la vida media del animal (Chianini, Fernández-Borges et al. 2012). A pesar de haberse demostrado su susceptibilidad, ésta parece ser particularmente baja dados los largos tiempos de incubación que mostraron los animales infectados experimentalmente, la tasa de ataque incompleta y teniendo en cuenta la ausencia de casos descritos en la naturaleza.

3.1.1. La PrP de conejo

Aunque *a priori* no pueden descartarse otros factores que determinen la elevada resistencia a EETs de los conejos, la PrP^C de esta especie ha recibido una especial atención en busca de las claves que parecen hacerla resistente al malplegamiento. Estudios realizados en *Drosophila* que expresan la PrP^C de hámster, ratón o conejo mostraron neurodegeneración al sobreexpresar la PrP de hámster, pero no así con la de ratón o la de conejo. Únicamente se observó disfunción motora en los modelos que expresan PrP de hámster y ratón, sugiriendo una menor propensión de la PrP de conejo a formar agregados neurotóxicos (Fernandez-Funez, Zhang et al. 2011). Dado que se dispone de la estructura de la PrP^C de conejo (PrP91-228) realizada mediante RMN, se ha podido comparar ésta con otras PrPs como la de humano, la bovina y la de ratón. Este estudio comparativo ha desvelado que la PrP de conejo muestra una inusual área continua de carga positiva en ambas superficies de la PrP, que podría inhibir interacciones PrP/PrP o con cofactores que podrían ser necesarios para su malplegamiento. También se han encontrado sutiles diferencias en el lazo rígido, que hacen que la PrP de conejo presente un lazo α 2- β 2 altamente ordenado que podría contribuir tanto a la estabilidad local como a la global de la proteína. De hecho, la alteración de uno sólo de los residuos de esta zona, concretamente la sustitución de la Serina 173 del conejo por la Asparagina correspondiente a la PrP de ratón, causa profundos efectos en la PrP como la alteración local y global de la distribución de cargas, reducción en el número de puentes de hidrógeno que estabilizan la estructura terciaria o mayor movilidad del lazo rígido; aunque el efecto que pudieran tener sobre la capacidad de malplegamiento es desconocido (Wen, Li et al. 2010).

También se han realizado numerosos estudios de simulación de dinámica molecular con la intención de identificar las diferencias y similitudes estructurales que presentan la PrP^C de conejo y las de perro y caballo entre sí y con la de especies susceptibles ((Zhang 2011), (Zhang and Liu 2011)). Aunque los diferentes estudios se realizaron en diferentes condiciones de pH y otros parámetros de simulación dificultando la interpretación de los resultados, concluyeron que en lo concerniente a la región carboxilo terminal, la PrP^C de conejo muestra una mayor estabilidad especialmente en la hélice- α 2, debido al característico puente salino entre el Ácido aspártico 177 y la Arginina 163 (D177-R163). También identificaron otras estructuras que podrían contribuir a su estabilidad, como el puente salino entre el Ácido aspártico 201 y la Arginina 155 (D201-R155) que conectan la hélice3 y la hélice 1 o el puente de hidrógeno entre la Histidina 186 y la Arginina 155 (H186-R155) (Zhang 2011).

Más allá de detectar regiones en la PrP^C de conejo que pudieran conferirle una mayor estabilidad y por consiguiente reducir su tendencia al malplegamiento, un estudio realizado por Vorberg y colaboradores trató de detectar residuos aminoacídicos concretos que explicaran la baja susceptibilidad

del conejo a la infección por priones. De esta forma, mediante la utilización de células de neuroblastoma de ratón que expresaban PrP^C de ratón con sustituciones de conejo, mostraron que la resistencia a la conversión de la PrP^C a PrP^{Sc} podía inducirse sustituyendo un solo residuo aminoacídico en la PrP de ratón, susceptible, por un aminoácido que se encuentra en la posición correspondiente en la secuencia de PrP de conejo, considerado resistente (Vorberg, Groschup et al. 2003). Este estudio se revisará en más detalle en el apartado de Discusión de esta tesis, puesto que persigue los mismos objetivos de determinar las posiciones clave para explicar la baja susceptibilidad del conejo, aunque mediante una técnica radicalmente distinta, la PMCA. Además del estudio de Chianini y colaboradores descrito anteriormente, otra prueba irrefutable de que la PrP^C de conejo puede malplegarse *in vivo* vino de la mano de Vidal y colaboradores. En este caso, se generaron ratones transgénicos que expresan la PrP de conejo en lugar de la PrP endógena de ratón, demostrando que la PrP^C era malplegada a su forma priónica tras la inoculación intracerebral de una serie de priones con orígenes diversos (Vidal, Fernandez-Borges et al. 2015).

Aunque los trabajos de Chianini, Vidal y colaboradores demostraron irrefutablemente que la PrP^C de conejo podía ser malplegada tanto *in vitro* como *in vivo*, el limitado éxito de las inoculaciones *in vivo* en el estudio de Chianini, parecía señalar hacia otros factores desconocidos e independientes de la PrP que podrían explicar la baja susceptibilidad de los lepóridos a las enfermedades priónicas. Pero la existencia de estos factores independientes de PrP^C que podrían existir en conejos y otras especies consideradas resistentes, ha sido refutada recientemente utilizando también animales transgénicos. En este caso, con el fin de estudiar la posible existencia de factores independientes de la PrP^C que pudieran determinar la baja susceptibilidad de los lepóridos, se generaron conejos transgénicos que expresan una PrP ovina altamente susceptible a scrapie (PrP^C ovina con polimorfismo V136 R154 Q171) junto con el gen endógeno de conejo. Estos animales, una vez inoculados con una cepa de scrapie, fueron completamente susceptibles sin mostrar interferencia aparente por parte de la PrP endógena, dado que no se encontró en las placas amiloideas localizadas en los encéfalos de los animales infectados (Sarradin, Viglietta et al. 2015).

Así pues, parece no existir ningún factor independiente de la PrP^C en los conejos que pueda explicar su baja susceptibilidad a la infección por priones. Por tanto, y a pesar de que los estudios de Chianini, Vidal y colaboradores parecen sugerir que tampoco la PrP^C es la responsable última de este fenómeno, dado que esta PrP se puede malplegar, se cree que al menos parte de la explicación de su elevada

resistencia debe residir en su secuencia primaria, lo cual se pretende estudiar mediante PMCA en esta tesis doctoral.

4. Sistemas de propagación *in vitro* de priones

Uno de los avances más significativos en el campo de la investigación de los priones ha sido la obtención de sistemas capaces de mimetizar *in vitro* el proceso de conversión que tiene lugar *in vivo* en animales y humanos afectados de las EETs. Por ello, con el objetivo de estudiar en detalle la naturaleza del agente infeccioso se han desarrollado distintos sistemas *in vitro* que imitan el proceso de conversión con una considerable reducción tanto del coste, como del tiempo de incubación observado con los modelos animales. En este apartado, se describirán algunos de estos sistemas de propagación de priones *in vitro* poniendo especial atención en la PMCA, que ha sido la principal técnica utilizada durante la realización de esta tesis.

4.1. Ensayo de conversión libre de células

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

El desarrollo de este sistema ha permitido la identificación de factores que afectan al proceso de conversión, así como al entendimiento de la barrera de transmisión (Raymond, Bossers et al. 2000). Sin embargo, la mayor aportación de este sistema de propagación ha sido la demostración de que la PrP^{Sc} es capaz de transformar la PrP^C en una isoforma anómala sin la interacción de ningún otro componente, tal como predice la hipótesis de "sólo proteína". No obstante, el bajo rendimiento de la conversión observada junto con las condiciones no fisiológicas empleadas durante el proceso de conversión y el exceso de PrP^{Sc} necesaria para iniciar la propagación, ha dificultado mucho la evaluación de la infectividad de la proteína generada *in vitro*.

4.2. Amplificación cíclica de proteínas malplegadas (PMCA)

En un intento de mejorar el sistema de conversión libre de células (Kocisko, Come et al. 1994), en el año 2000 se realizó la primera transformación de PrP^C en PrP^{Sc} partiendo de cantidades ínfimas de esta

última mediante el uso de la sonicación (Saborio, Permanne et al. 2001). Este estudio dio lugar al inicio de la técnica de amplificación cíclica de proteínas malplegadas o PMCA. Dos elementos fueron claves para el desarrollo de esta técnica: i) el sistema previo del grupo de Caughey que demostró la capacidad de replicación de una proteína por sí misma en un tubo de ensayo (Kocisko, Come et al. 1994) y ii) un sistema cíclico basado en un baño de ultrasonidos/incubación que facilitó el proceso (Saborio, Permanne et al. 2001). Conceptualmente, la PMCA es análoga de la amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (del inglés, *Polymerase Chain Reaction*) donde un molde crece a expensas de un sustrato en una reacción cíclica.

Aunque la PMCA inicialmente fue desarrollada para ser realizada manualmente, pronto fue automatizada (PMCAa) con el fin de aumentar su sensibilidad, especificidad y rendimiento (Castilla, Saa et al. 2005, Saa, Castilla et al. 2005, Castilla, Saa et al. 2006, Saa, Castilla et al. 2006). La técnica, representada en la figura 8, se basa en un proceso cíclico que permite una replicación acelerada de priones *in vitro*, en el cual cada ciclo se compone de dos fases. Durante la primera fase, la muestra que contiene pequeñas cantidades de PrP^{Sc} que actúa de molde es incubada en presencia de un gran exceso de PrP^C, el sustrato de la reacción, lo cual induce la formación de los agregados de PrP^{Sc}. Tras esta fase de incubación, las muestras se someten a la acción de ultrasonidos con el fin de romper los agregados de PrP^{Sc}, multiplicando así el número de núcleos de crecimiento para la continua conversión posterior. Con cada ciclo sucesivo, se produce un aumento exponencial de “semillas” acelerándose el proceso de conversión exponencialmente (Saa, Castilla et al. 2005). De esta manera, tras varios ciclos de incubación-sonicación se incrementan significativamente los niveles de priones en la muestra desde valores indetectables hasta niveles fácilmente detectables mediante técnicas bioquímicas (Saborio, Permanne et al. 2001).

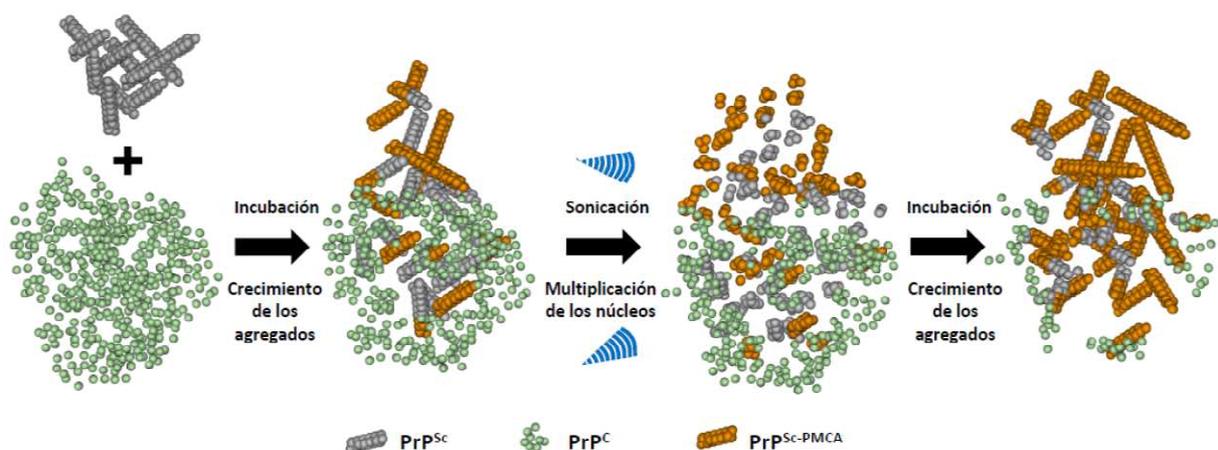


Figura 8: Representación esquemática de un ciclo de PMCA. Están representadas las dos fases que comprenden un ciclo de PMCA: i) fase de crecimiento de los agregados; y ii) fase de multiplicación de los núcleos.

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

La PMCA ha demostrado ser un método eficaz *in vitro* al mimetizar algunos de los pasos fundamentales implicados en la replicación de priones *in vivo*. Se trata de una técnica de gran utilidad para replicar de manera eficiente una variedad de cepas de priones infecciosas en distintas especies manteniendo las características de dicha cepa (Castilla, Morales et al. 2008). Esta técnica también es capaz de reproducir gran parte de los fenómenos de barrera de especie y adaptación característicos de muchas cepas de prion (Castilla, Gonzalez-Romero et al. 2008). Sin embargo, no podemos olvidar que la PMCA nació fundamentalmente para mejorar el diagnóstico de las EETs y, por ello, ha sido utilizada para la detección de priones en la mayoría de los tejidos y fluidos corporales. A modo de ejemplo, esta metodología se utilizó para detectar por primera vez priones en sangre proveniente de animales tanto sintomáticos como presintomáticos (Castilla, Saa et al. 2005, Saa, Castilla et al. 2006).

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

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

4.2.1. El uso de PrP recombinantes en PMCA

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

Otro estudio desarrollado por el grupo del Jiyang Ma demostró que es posible la generación de priones recombinantes *in vitro* de una manera espontánea, sin la ayuda de ninguna semilla de PrP^{Sc}. Para ello, se utilizó un sustrato basado en la proteína rec-PrP complementada con la adición de 2 cofactores: ARN y lípidos. El estudio se realizó en condiciones libre de priones y dio lugar a una nueva cepa de prion recombinante generada *in vitro* que demostró tener una gran infectividad cuando se testó en animales de genotipo salvaje (Wang, Wang et al. 2010, Wang, Wang et al. 2011). No obstante, a pesar de que se han generado priones recombinantes infecciosos con un mínimo de cofactores, la técnica presenta mayor eficiencia para la generación de PrP^{res} cuando se complementa la PrP recombinante del sustrato con homogenizado de encéfalo.

El uso de PrP recombinante como sustrato para PMCA presenta como una de sus principales ventajas, la posibilidad de generar y evaluar la capacidad de propagación de PrP con cualquier mutación o alteración. Por ello, resulta una de las mejores herramientas disponibles actualmente para el estudio de las regiones o residuos aminoácidos determinantes de barreras de transmisión interespecies, siendo la técnica escogida para el estudio que se presenta en esta tesis doctoral.

4.3. Conversión Inducida por Agitación (QUIC, *QUaking Induced Conversion*)

No se puede concluir este apartado sin presentar otro de los métodos más populares para el malplegamiento de priones *in vitro*, denominado QUIC y derivado del procedimiento de PMCA con sustrato basado en PrP recombinante. Este método, sustituye la sonicación aplicada durante la PMCA por agitación, de forma que se elimina la variabilidad de la energía que alcanza a cada muestra según su posición propia de la sonicación. Muestra una sensibilidad para la detección de cantidades ínfimas de prion muy similar a la de la PMCA pero es más rápido, simple y reproducible en cuanto a detección de priones. Ya que se ha podido semi-automatizar utilizando placas de 96 pocillos y acoplando el sistema a un lector de fluorescencia, que mediante el uso de Tioflavina T (ThT, del inglés, *Thioflavine T*) permite monitorizar la formación de fibras amiloides en tiempo real. No obstante, aunque se trata de una importante herramienta para la detección de priones y para el diagnóstico de enfermedades priónicas, su principal desventaja frente a la PMCA, es que las fibras amiloides producidas no son infecciosas, limitando su utilidad para estudios de infectividad o estructurales entre otros ((Atarashi, Wilham et al. 2008), (Ryou and Mays 2008)).

OBJETIVOS

1. Determinación de la capacidad de propagación *in vitro* de la PrP recombinante de conejo inducida por priones de diferentes orígenes.
2. Evaluación de los determinantes moleculares que modulan la resistencia al malplegamiento de la PrP recombinante de conejo utilizando la PrP de ratón como modelo.
 - a. Generación de PrP recombinantes de conejo con sustituciones aminoacídicas de ratón.
 - b. Estudio de la capacidad de propagación *in vitro* de los priones murinos utilizando las PrP recombinantes modificadas como sustrato.
 - c. Caracterización bioquímica de los priones recombinantes generados.
3. Análisis bioquímico y estructural del efecto de los aminoácidos con mayor influencia sobre el malplegamiento de la PrP recombinante de conejo.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Construcción de los plásmidos de expresión de las PrP de conejo, ratón y hámster sirio

La generación de las proteínas del prión recombinante de conejo, ratón y hámster sirio se realizó mediante la utilización de vectores plasmídicos especializados en la expresión de genes, incorporados mediante técnicas de biología molecular; en este caso, los vectores pOPIN desarrollados por *Oxford Protein Production Facility UK* (OPPF). Los vectores pOPIN están diseñados para la clonación mediante recombinación homóloga, concretamente mediante el método de clonación *In Fusion*, que permite una alta expresión de la proteína clonada (Berrow, Alderton et al. 2007). En este caso, se seleccionó el vector 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 carboxi-peptidasa A seguida de una cola de 6 Histidinas en el extremo C-terminal de la proteína de interés para su posterior purificación mediante cromatografía de afinidad.

El vector pOPIN E fue digerido con las enzimas de restricción NcoI y PmeI (New England Laboratories) siguiendo el protocolo especificado por OPPF (*A Guide to using the OPPF pOPIN Vector suite for HTP In-Fusion Cloning*). Una vez digerido, las bandas de ADN (ácido desoxirribonucleico) fueron separadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) (Pronadisa) y visualizadas mediante tinción con bromuro de etidio (EtBr) 0.1% (p/v) (Sigma-Aldrich). El vector linealizado de 5151 pares de bases fue purificado mediante *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) siguiendo las especificaciones del kit.

Los extremos de las secuencias de los genes de las PrPs de conejo, ratón y hámster fueron adecuados mediante la técnica de PCR para su posterior clonación en el vector pOPIN E mediante el método de clonación *In Fusion*. Para ello, los oligonucleótidos se diseñaron teniendo en cuenta las especificaciones señaladas en el protocolo de la OPPF. Cabe destacar que el diseño de estos oligonucleótidos es crítico para una adecuada recombinación homóloga mediante este método de clonación y, por este motivo, los oligonucleótidos se diseñaron para contener al menos 15 pares de bases que hibridaban en la secuencia del punto de inserción del vector de clonación. Además, en el oligonucleótido del extremo carboxilo terminal fue introducido un codón de terminación (TTA) en la posición de la Lisina (K) de la cola de Histidinas con el fin de evitar el corte con carboxi-peptidasa A tras la purificación. El uso de esta enzima es necesario para eliminar la cola de histidinas de la proteína purificada tal como está indicado en el protocolo del fabricante de los vectores pOPIN E. Las secuencias 5'3' de los oligonucleótidos diseñados fueron las siguientes (la secuencia en negrita pertenece a la secuencia del gen de la PrP):

- Oligonucleótido del extremo amino terminal para la PrP de conejo:
AGGAGATATACCATGAAGAAGCGGCCGAAGCCTGG
- Oligonucleótido del extremo carboxilo terminal para la PrP de conejo:
GTGATGGTGATGTTAGCCGGCCGCCCTCTGGTAGGC

- Oligonucleótido del extremo amino terminal para la PrP de ratón:
AGGAGATATACCATGAAAAAGCGGCCAAAGCCTGAA
- Oligonucleótido del extremo carboxilo terminal para la PrP de ratón:
GTGATGGTGATGTTAGGATCTTCTCCGTCGTAATA
- Oligonucleótido del extremo amino terminal para la PrP de hámster:
AGGAGATATACCATGAAGAAGCGGCCAAAGCCTGG
- Oligonucleótido del extremo carboxilo terminal para la PrP de hámster:
GATGGTGATGGTGATGTTAGGACCTTCTTCATC

Partiendo de los plásmido que contenían el gen de la PrP de conejo, (pCMV PrP Rabbit (*PRNP*)) procedente del laboratorio de Claudio Soto, el gen de la PrP de ratón (pDrive mouse PrP) procedente del laboratorio de Joaquín Castilla y el gen de la PrP de hámster (pCMV PrP Hamster (*PRNP*)) procedente también del laboratorio de Claudio Soto, se realizó una PCR de cada uno, con el fin de amplificar la secuencia de ADN de interés utilizando los oligonucleótidos específicamente diseñados y mostrados anteriormente. Los reactivos contenidos en las reacciones de PCR fueron: 2-10 ng de plásmido, 50 ng de cada uno de los oligonucleótidos (Sigma), 1,25 unidades LongAmp™ Taq DNA Polymerase (New England Biolabs), 10 µl 5X LongAmp™ Taq Reaction Buffer (New England Biolabs), 0,4 µl dNTP 10Mm (Sigma-Aldrich), H₂O desionizada (hasta alcanzar un volumen final de reacción de 50 µl). Las condiciones de PCR aplicadas fueron en primer lugar, un ciclo inicial de desnaturalización del molde de ADN de partida mediante calentamiento a 95°C durante 5 min, a continuación, 35 ciclos de amplificación y finalmente, un periodo adicional de 10 min a 72°C que permite la extensión de los productos de PCR incompletos. Cada ciclo de amplificación consistió en un periodo de desnaturalización a 95°C durante 20 s, seguido de un periodo de 45 s a 56°C que facilita la hibridación de los oligonucleótidos con el molde de ADN y finaliza con un periodo de 60 s a 72°C que permite la polimerización de las nuevas cadenas de ADN. El producto de PCR fue almacenado y conservado a 4°C. Para realizar las PCRs se empleó el termociclador *DNA Engine Peltier Thermal Cycler, PTC-200* (Bio-Rad).

A continuación y siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial, el producto amplificado mediante PCR se digirió con la enzima de restricción DpnI (New England Biolabs) para eliminar los fragmentos de ADN metilados procedentes del molde de ADN utilizado en la reacción de PCR. Las muestras digeridas fueron purificadas mediante *QIAquick PCR purification kit* (Qiagen) siguiendo las especificaciones del kit.

Finalmente, tras la linearización del vector pOPIN E y la adecuación de los extremos de los insertos que contienen el gen de la PrP descritos anteriormente, se realizaron las recombinaciones homólogas necesarias para la clonación de estos fragmentos en el vector mediante el método de clonación *In Fusion Dry-Down PCR Cloning Kit* (Clontech), siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Para ello y tras determinar las concentraciones de vector e inserto mediante el equipo *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific), los reactivos fueron mezclados en un ratio molar 2:1 (vector : inserto), concretamente, 150 ng de vector y 45 ng de inserto.

Con el fin de obtener vectores en alto número de copia, las clonaciones por recombinación fueron transformadas en bacterias ultra-competentes *Escherichia coli DH5 XL-Gold*[®] (Stratagene) siguiendo el protocolo estándar de transformación mediante choque térmico descrito por Inoue et al (Inoue, Nojima et al. 1990). Todas las colonias bacterianas obtenidas se cultivaron en 2 ml de medio de cultivo Luria Bertoni (LB) (Pronadisa) con 50 µg/ml de ampicilina (Sigma-Aldrich) y se incubaron a 37°C en agitación toda la noche. Partiendo de estos cultivos, los plásmidos procedentes de colonias bacterianas se purificaron empleando el *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen) y siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Para verificar que los plásmidos purificados tenían incorporados los genes de las PrPs de conejo y ratón se realizó un análisis de restricción de los plásmidos con la enzima de restricción Aval (New England Biolabs) siguiendo el protocolo del fabricante. Finalmente, con el fin de asegurar que los plásmidos obtenidos contenían las secuencias correcta, el gen de la PrP y los extremos adyacentes fueron completamente secuenciados mediante el servicio de secuenciación de Stabvida (www.stabvida.com) empleando el oligonucleótido universal T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3').

De este modo, se generaron los plásmidos pOPIN E de expresión de proteínas que contenía los genes de las PrPs recombinantes de conejo, ratón y hámster:

- pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ de conejo
- pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ de ratón
- pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ de hámster

Mediante esta metodología que conlleva un proceso simple y muy eficiente se minimizó el número de manipulaciones necesarias en la construcción de los vectores de expresión.

2. Construcción de los plásmidos de expresión de la PrP de conejo con sustituciones de la PrP de ratón

2.1. Selección de las mutaciones

Con el fin de estudiar la barrera de transmisión interespecies entre ratón y conejo se realizó un alineamiento comparativo de las secuencias primarias de las PrPs recombinantes de ratón y conejo. Del alineamiento realizado con ClustalW (EMBL-EBI) que se muestra en la figura 1, fueron seleccionadas varias de las diferencias aminoacídicas que presentan ambas secuencias:

recPrP Conejo	MKKRPKPGGGWNTGGSRYPGQSSPGGNRYPPQGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHG
recPrP RatónG.....T.....S.....S.....
	23 78
recPrP Conejo	GGWGQPHGGGWGQGG-THNQWGKPSKPKTSMKXVAGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSAMS
recPrP RatónG.....N.....NL.....
	79 134
recPrP Conejo	RPLIHFGNDYEDRYYRENMYRYPNQVYRYPVDQYSNQNSFVHDCVNIITVKQHTVTTTT
recPrP Ratón	..M.....W.....N.....I.....
	135 191
recPrP Conejo	TKGENFTETDIKIMERVVEQMCITQYQCESQAAYQRAAG-
recPrP RatónV.M.....V.....K.....Y.DGRRS-
	192 230

Mutaciones puntuales seleccionadas: G99N, S107N, M108L, L137M, Y144W, S173N, V183I, I202V, I204M, I214V, Q219K

Figura 9. Alineamiento de secuencias primarias de las PrPs recombinantes de conejo y ratón. Mutaciones descartadas señaladas en gris y las seleccionadas en verde y listadas con la numeración de aminoácidos correspondiente a la PrP de ratón, idéntica para el caso de la PrP de conejo.

Las diferencias aminoacídicas marcadas en gris no se escogieron para generar PrP de conejo mutadas por su situación en la secuencia. Las mutaciones en residuos anteriores al 90 se descartaron porque, tal y como se detalla en el apartado 2 de Resultados, se encuentran en la zona de las octa repeticiones que aunque implicada de alguna forma en la fisiopatología de las EETs, no es esencial para que un determinado prion cause enfermedad ni para su propagación (Yam 2010). Además, la ausencia de diferencias en el número de octa repeticiones y su gran similitud con tan solo 4 sustituciones conservadas, llevó a la suposición de que esta región en particular podría ser poco relevante para la barrera de transmisión entre ambas especies. En cuanto a las sustituciones en el extremo carboxilo terminal, también se han descartado debido a que es la zona de unión a GPI *in vivo*, aspecto que no puede modelarse mediante la rec-PMCA al carecer las PrP recombinantes de dicha modificación postraduccional. Así pues, se decidió realizar las siguientes construcciones de PrP recombinante de conejo mutadas:

- Conejo G99N
- Conejo S107N
- Conejo M108L
- Conejo L137M
- Conejo Y144W
- Conejo S173N
- Conejo V183I
- Conejo I202V
- Conejo I204M
- Conejo I214V
- Conejo Q219K

2.2 Diseño de oligonucleótidos

Con el fin de realizar las sustituciones genéticas mencionadas anteriormente se diseñaron parejas de oligonucleótidos que incorporaban el cambio de nucleótido correspondiente (ver listado más adelante). El tamaño de los oligonucleótidos lo determinó el tipo de secuencia a los lados de la base a sustituir (aproximadamente 10 pares de bases hacia el extremo amino terminal y 10 pares de bases hacia el extremo carboxilo terminal). Mediante este esquema de trabajo se diseñó la secuencia del oligonucleótido *forward* (del inglés, hacia adelante) (F) y la secuencia del oligonucleótido *reverse* (del inglés, reverso) (R) se obtuvo a partir de la secuencia reversa y complementaria del oligonucleótido *forward*. La selección de los mejores oligonucleótidos posibles se refinó mediante el software libre “Oligo analyzer 3.1” (Integrated DNA Technologies).

En el siguiente esquema se muestran los oligonucleótidos *forward* y *reverse* empleados señalizando el nucleótido que se ha modificado (en negrita) en el codón (subrayado) que codifica el aminoácido sustituido:

G99N (F): 5'-CACAACCAGTGGACAAAGCCCAGTAAG-3'
 G99N (R): 5'-CTTACTGGGCTTGTTCCACTGGTTGTG-3'
 S107N (F): 5'-GCCGAAAACCAACATGAAGCACGTGG-3'
 S107N (R): 5'-CCACGTGCTTCATGTTGGTTTTTCGGC-3'
 M108L (F): 5'-CCGAAAACCAGCCTGAAGCACGTGGC-3'
 M108L (R): 5'-GCCACGTGCTTCAGGCTGGTTTTTCGG-3'
 L137M (F): 5'-CATGAGCAGGCCCATGATCCACTTCGGC-3'
 L137M (R): 5'-GCCGAAGTGGATCATGGGCCTGCTCATG-3'
 Y144W (F): 5'-CTTCGGCAACGACTGGGGAGGACCGCTAC-3'
 Y144W (R): 5'-GTAGCGGTCTCCCAGTCGTTGCCGAAG-3'
 S173N (F): 5'-CAACCAGAACAAACTTCGTGCACGACTG-3'
 S173N (R): 5'-CAGTCGTGCACGAAGTTGTTCTGGTTG-3'
 V183I (F): 5'-CAACATCACGATTAAAGCAGCACACGGTG-3'
 V183I (R): 5'-CACCGTGTGCTGCTTAATCGTGATGTTG-3'
 I202V (F): 5'-CGAGACCGACGTCAAGATCATGGAG-3'
 I202V (R): 5'-CTCCATGATCTTGACGTCGGTCTCG-3'
 I204M (F): 5'-CGACATCAAGATGATGGAGCGCGTG-3'
 I204M (R): 5'-CACGCGCTCCATCATCTTGATGTGCG-3'
 I214V (F): 5'-GCAGATGTGCGTCACGCAGTACC-3'
 I214V (R): 5'-GGTACTGCGTGACGCACATCTGC-3'
 Q219K (F): 5'-CACGCAGTACCAGAAGGAGTCCCAGG-3'
 Q219K (R): 5'-CCTGGGACTCCTTCTGGTACTGCGTG-3'

2.3 Mutagénesis dirigida secuencial en dos pasos

Partiendo de los plásmidos pOPIN E que expresan la PrP₂₃₋₂₃₁ de conejo, se efectuaron mutagénesis dirigidas secuenciales de dos pasos. Para ello, además de los oligonucleótidos específicos para cada sustitución, se diseñaron dos oligonucleótidos que hibridan con una secuencia del vector pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ de conejo próxima al gen que codifica la PrP, un oligonucleótido *forward* cerca del extremo amino terminal y un oligonucleótido *reverse* cerca del extremo carboxilo terminal:

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

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

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

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

Las condiciones de PCR aplicadas fueron en primer lugar, un ciclo inicial de desnaturalización del molde de ADN de partida mediante calentamiento a 95°C durante 5 min, a continuación, 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 ADN y finaliza con un periodo de 60 s a 72°C que permite la polimerización de las nuevas cadenas de ADN. Los productos de PCR 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 conejo con la mutación de interés. La purificación de los mismos se llevó a cabo mediante la utilización del kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante (*QIAquick® Spin Handbook*).

El segundo paso de la mutagénesis dirigida consistió en la reconstitución completa del gen que codifica la PrP de conejo conteniendo la mutación de interés. Para ello se realizó de nuevo una PCR empleando como moldes

los dos fragmentos obtenidos en el paso anterior y los oligonucleótidos *forward* que hibrida cerca del extremo amino terminal y *reverse* que hibrida cerca del carboxilo terminal del gen que codifica la PrP.

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

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

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

2.4 Clonación de los genes que codifican las PrP₂₃₋₂₃₁ de conejo mutadas en el vector de expresión de proteínas pOPIN E

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

En primer lugar, los fragmentos de ADN que codifican la PrP₂₃₋₂₃₁ de conejo se digirieron con la enzima de restricción XbaI (Fermentas) y posteriormente, tras realizar una purificación con *GeneJet PCR Purification Kit* (Fermentas), se digirieron con la enzima de restricción PstI (Fermentas), en todos los casos, siguiendo las especificaciones del fabricante. La enzima de restricción XbaI reconoce una secuencia de ADN ubicada en el vector cerca del extremo amino terminal de la secuencia del gen que codifica la PrP₂₃₋₂₃₁ de conejo, mientras que PstI digiere en una zona del vector cercana al extremo carboxilo terminal, dando lugar a un fragmento de 1078 pares de bases. Para la elección de las enzimas de restricción mencionadas se utilizó el software libre "NEBcutter V2.0" (New England Biolabs). Los fragmentos digeridos se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v), tinción con EtBr 0,1% (p/v) y *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen), siguiendo el protocolo del fabricante.

El plásmido pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ de conejo fue digerido con las enzimas de restricción XbaI y PstI, siguiendo el procedimiento mencionado anteriormente. Los fragmentos de 4707 pares de bases fueron purificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, tinción con EtBr 0,1% y *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante.

Los fragmentos correspondientes a las secuencias de los genes que codifican las PrPs₂₃₋₂₃₁ de conejo mutadas fueron clonados en el vector pOPIN E de conejo obtenido en el paso anterior. Para ello, plásmido e

inserto fueron mezclados en un ratio molar 3:1 (vector : inserto) y se efectuó la ligación mediante la enzima *T4 DNA ligasa* (Fermentas) incubando la mezcla reactiva a 16°C, como indica el protocolo del fabricante. Los productos de la ligación se transformaron en bacterias ultra-competentes *E. coli DH5 XL-Gold®* (Stratagene) siguiendo el protocolo estándar de transformación por choque térmico. De cada transformación se seleccionaron 4-6 colonias bacterianas y los plásmidos procedentes de estas colonias bacterianas se purificaron mediante *GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Para verificar que los plásmidos purificados tenían incorporado el gen que codifica la PrP₂₃₋₂₃₁ se realizó un análisis de restricción con las enzimas de restricción XbaI (Fermentas) y PstI (Fermentas) siguiendo el protocolo del fabricante. Finalmente, con el fin de asegurar que los plásmidos obtenidos contenían la mutación introducida, el gen que codifica la PrP₂₃₋₂₃₁ fue completamente secuenciado mediante el servicio de secuenciación de Stabvida con el oligonucleótido universal T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'). A continuación se listan los plásmidos generados mediante la metodología detallada:

- pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ conejo G99N
- pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ conejo S107N
- pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ conejo M108L
- pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ conejo L137M
- pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ conejo Y144W
- pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ conejo S173N
- pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ conejo V183I
- pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ conejo I202V
- pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ conejo I204M
- pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ conejo I214V
- pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ conejo Q219K

3. Construcción de los plásmidos de expresión de las PrPs de conejo mutadas más susceptibles a RML con sustituciones alternativas a las de la PrP de ratón

3.1. Selección de las mutaciones

Con el fin de conocer en mayor detalle el papel que juegan las sustituciones realizadas en aquellas PrPs de conejo mutadas que han resultado más susceptibles al prion murino RML y aclarar si la ausencia del aminoácido original es suficiente para incrementar la susceptibilidad o el aminoácido por el que se sustituye resulta ser el factor más crítico, se realizó un alineamiento comparativo de las secuencias primarias de las PrP recombinantes de conejo y diversas especies de mamífero. Centrándonos en las 3 sustituciones de ratón que confirieron mayor susceptibilidad a la PrP de conejo al prion murino RML y con la idea de no alterar excesivamente la estructura global de la PrP, se decidió realizar sustituciones alternativas en las mismas posiciones basándonos en los aminoácidos que presentan en dichas posiciones otras especies aparte del conejo y el ratón. En la figura 2 se

muestra el alineamiento de las PrPs recombinantes de conejo (*Oryctolagus cuniculus*), ratón (*Mus musculus*), topillo rojo (*Myodes glareolus*), hámster sirio (*Mesocricetus auratus*), oveja (*Ovis aries*, con polimorfismo ARQ), vaca (*Bos taurus*), ciervo mula (*Odocoileus hemionus*), caballo (*Equus ferus caballus*), cerdo (*Sus scrofa*), humano (*Homo sapiens*, con polimorfismo M129M), perro (*Canis lupus familiaris*), gato (*Felis silvestris catus*) y visón (*Neovison vison*). A partir de este alineamiento realizado con ClustalW (EMBL-EBI) se escogieron sustituciones alternativas para las posiciones 108 y 202, mientras que para la posición 107 no se encontró ningún residuo alternativo. Las PrPs de conejo con las sustituciones alternativas son:

- Conejo M108I
- Conejo I202M

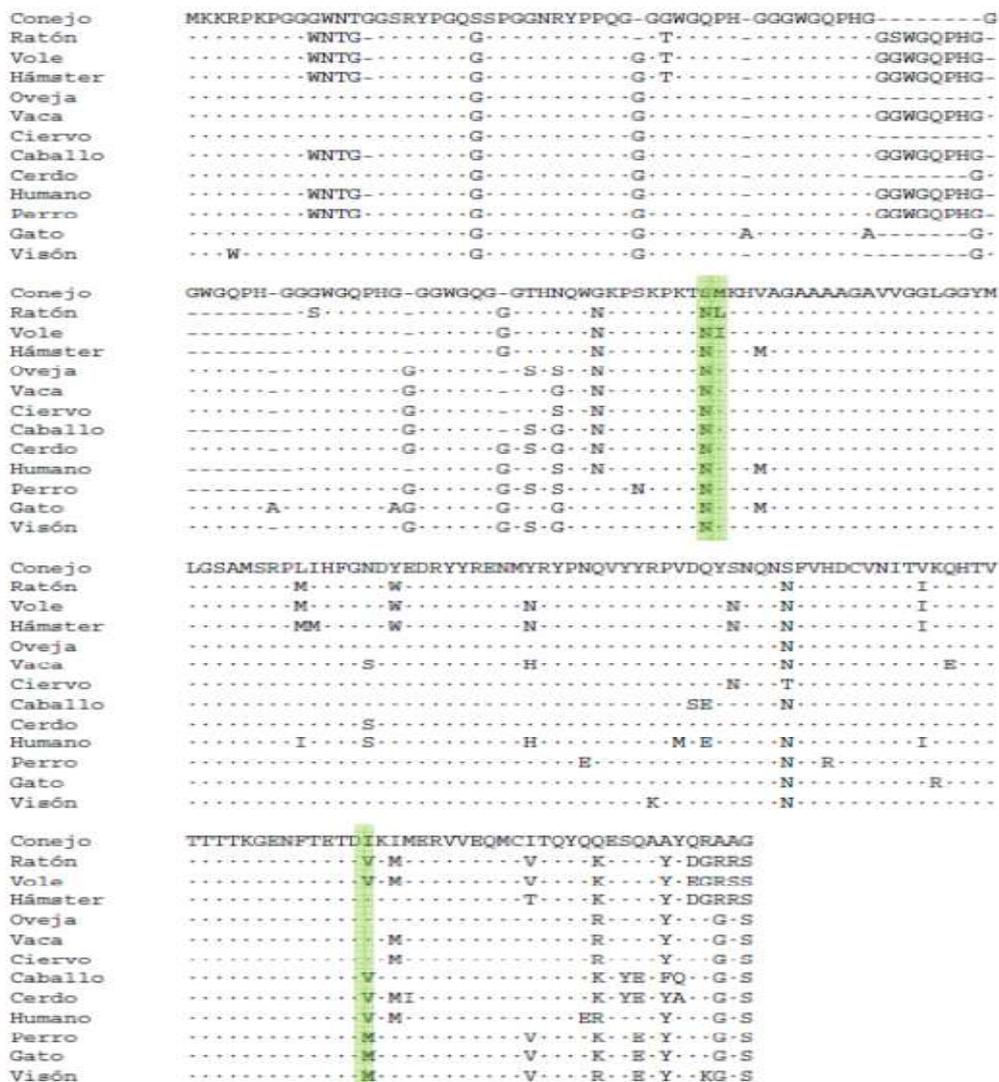


Figura 10. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las PrPs recombinantes de diversas especies de mamífero. Las secuencias de PrP recombinante de conejo, ratón, topillo rojo (vole), hámster sirio, oveja (con polimorfismo ARQ), vaca, ciervo

mula, caballo, cerdo, humano (con polimorfismo M129M), perro, gato y visón fueron comparadas mediante alineamiento con ClustalW. Los aminoácidos iguales a los de la secuencia de conejo se indican por un punto. Señaladas en verde se muestran las posiciones 107, 108 y 202, según la numeración de la PrP de conejo.

3.2 Diseño de oligonucleótidos

De la misma forma que en el apartado 2.2., se diseñaron parejas de oligonucleótidos que incorporaban el cambio de nucleótido correspondiente para la generación de los mutantes mencionados anteriormente. A continuación se listan los oligonucleótidos *forward* y *reverse* señalizando el nucleótido que se ha modificado (en negrita) en el codón (subrayado) que codifica el aminoácido sustituido:

M108I (F): 5'-GCCGAAAACAGCATCAAGCACGTGGCCGGGG-3'

M108I (R): 5'-CCCCGGCCACGTGCTTGATGCTGGTTTTCGGC-3'

I202M (F): 5'-CACCGAGACCGACATGAAAGATCATGG-3'

I202V (R): 5'-CCATGATCTTCATGTCGGTCTCGGTG-3'

3.3 Mutagénesis dirigida secuencial en dos pasos

Igual que en el apartado 2.3., partiendo de los plásmidos pOPIN E que expresan la PrP₂₃₋₂₃₁ de conejo, se efectuaron mutagénesis dirigidas secuenciales de dos pasos. Para ello, además de los oligonucleótidos específicos para cada sustitución, se utilizaron los mismos dos oligonucleótidos que hibridan con el vector pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ de conejo, el *forward* cercano al extremo amino terminal y el oligonucleótido *reverse* cercano al extremo carboxilo terminal:

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

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

En un primer paso se realizaron dos PCRs, una de ellas con el oligonucleótido *forward* que contenía la mutación a introducir y el oligonucleótido *reverse* del extremo carboxilo terminal del gen que codifica la PrP; y la otra con el oligonucleótido *forward* del extremo amino terminal del gen que codifica la PrP y el oligonucleótido *reverse* que contiene la mutación. En todos los casos las PCRs fueron realizadas de forma idéntica a las del apartado 2.3. con:

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

También las condiciones de PCR se mantuvieron inalteradas, con un ciclo inicial de calentamiento a 95°C durante 5 min, a continuación, 40 ciclos de amplificación y finalmente, un periodo adicional de 10 min a 72°C. Cada ciclo de amplificación consistió en un periodo de desnaturalización de 95°C durante 20 s, seguido de un periodo de hibridación de 45 s a 56°C y finaliza con un periodo de 60 s a 72°C. 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 conejo con la mutación de interés. La purificación de los mismos se llevó a cabo mediante la utilización del kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante (*QIAquick® Spin Handbook*).

El segundo paso de la mutagénesis dirigida consistió en la reconstitución completa del gen que codifica la PrP de conejo conteniendo la mutación de interés. Para ello se realizó de nuevo una PCR igual que la del apartado 2.3., empleando como moldes los dos fragmentos obtenidos en el paso anterior y los oligonucleótidos *forward* y *reverse* que hibridan con el vector. En todos los casos y en esta última fase, las PCRs empleadas contenían:

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

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

3.4 Clonación de los genes que codifican las PrPs₂₃₋₂₃₁ de conejo con mutaciones alternativas en el vector de expresión de proteínas pOPIN E

De forma idéntica a como se hizo para las sustituciones de ratón en la PrP de conejo, se llevaron a cabo las siguientes digestiones con enzimas de restricción y purificaciones con el fin de ligar los distintos fragmentos de ADN codificantes generados en el apartado anterior en el vector de expresión pOPIN E.

En primer lugar, los fragmentos de ADN que codifican las PrPs₂₃₋₂₃₁ de conejo con las sustituciones deseadas se digirieron con la enzima de restricción XbaI (Fermentas) y posteriormente, tras realizar una purificación con *GeneJet PCR Purification Kit* (Fermentas), se digirieron con la enzima de restricción PaeI (Fermentas), dando lugar a un fragmento de 1078 pares de bases. Los fragmentos digeridos se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v), tinción con EtBr 0,1% (p/v) y *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen), siguiendo el protocolo del fabricante.

El plásmido pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ de conejo fue digerido con las enzimas de restricción XbaI y PstI, siguiendo el procedimiento mencionado anteriormente. El fragmento de 4707 pares de bases fue purificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, tinción con EtBr 0,1% y *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante.

Los fragmentos correspondientes a las secuencias de los genes que codifican las PrPs₂₃₋₂₃₁ de conejo con las sustituciones alternativas fueron clonados en el vector pOPIN E de conejo obtenido en el paso anterior. Para ello, plásmido e inserto fueron mezclados en un ratio molar 3:1 (vector : inserto) y se efectuó la ligación mediante la enzima *T4 DNA ligasa* (Fermentas) incubando la mezcla reactiva a 16°C, como indica el protocolo del fabricante. Los productos de la ligación se transformaron en bacterias ultra-competentes *E. coli DH5 XL-Gold*[®] (Stratagene) siguiendo el protocolo estándar de transformación por choque térmico. De cada transformación se seleccionaron 4-6 colonias bacterianas y los plásmidos procedentes de estas colonias bacterianas se purificaron mediante *GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Para verificar que los plásmidos purificados tenían incorporado el gen que codifica la PrP₂₃₋₂₃₁ se realizó un análisis de restricción con las enzimas de restricción XbaI (Fermentas) y PstI (Fermentas) siguiendo el protocolo del fabricante. Finalmente, el gen que codifica la PrP₂₃₋₂₃₁ fue completamente secuenciado mediante el servicio de secuenciación de Stabvida con el oligonucleótido universal T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'). A continuación se listan los plásmidos generados mediante la metodología detallada:

- pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ conejo M108I
- pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ conejo I202M

4. Construcción de los plásmidos de expresión de las PrPs de ratón con sustituciones de la PrP de conejo

4.1. Selección de las mutaciones

Con la idea de evaluar el papel de las sustituciones realizadas en la PrP de conejo pero en el contexto de la PrP de ratón y conocer en mayor detalle los residuos determinantes en la barrera de transmisión en estudio, se decidió realizar las sustituciones inversas a las realizadas en el apartado 2. Es decir, los mismos residuos aminoacídicos mutados en la PrP de conejo inicialmente, se sustituyeron en la PrP recombinante de ratón por los aminoácidos que presenta la PrP de conejo en esas mismas posiciones, con la intención de verificar si los mismos que susceptibilizan la PrP de conejo al prion murino RML podrían bloquear la propagación del mismo en las PrPs de ratón mutadas. Así se decidió generar los mutantes listados a continuación, basados de nuevo en la alineación entre las PrP recombinantes de conejo y ratón que se muestran en la figura 1:

- Ratón N99G
- Ratón N107S
- Ratón L108M
- Ratón M137L
- Ratón W144Y

- Ratón N173S
- Ratón I183V
- Ratón V202I
- Ratón M204I
- Ratón V214I
- Ratón K219Q

4.2. Diseño de oligonucleótidos

De la misma forma que en el apartado 2.2., se diseñaron parejas de oligonucleótidos que incorporaban el cambio de nucleótido correspondiente para la generación de los mutantes mencionados anteriormente. A continuación se listan los oligonucleótidos *forward* y *reverse* señalizando el nucleótido que se ha modificado (en negrita) en el codón (subrayado) que codifica el aminoácido sustituido:

N99G (F): 5'-CATAATCAGTGGGGCAAGCCCAGC-3'
 N99G (R): 5'-GCTGGGCTTGCCCCACTGATTATG-3'
 N107S (F): 5'-CCAAAAACCTTCCCTCAAGCATGTGG-3'
 N107S (R): 5'-CCACATGCTTGAGGGAGGTTTTTGG-3'
 L108M (F): 5'-CCAAAAACCAACATGAAGCATGTGGCAG-3'
 L108M (R): 5'-CTGCCACATGCTTCATGTTGGTTTTTGG-3'
 M137L (F): 5'-GAGCAGGCCCTCATCCATTTTGG-3'
 M137L (R): 5'-CCAAAATGGATGAGGGGCCTGCTC-3'
 W144Y (F): 5'-GCAACGACTACGAGGACCGCTAC-3'
 W144Y (R): 5'-GTAGCGGTCCTCGTAGTCGTTGC-3'
 N173S (F): 5'-CAGTACAGCAACCAGAACAGCTTCGTGCACGACTGCGTC-3'
 N173S (R): 5'-GACGCAGTCGTGCACGAAGCTGTTCTGGTTGCTGTACTG-3'
 I183V (F): 5'-CGACTGCGTCAATATCACGTCAAGCAGCACACGGTCACC-3'
 I183V (R): 5'-GGTGACCGTGTGCTGCTTGACGGTGATATTGACGCAGTCG-3'
 V202I (F): 5'-GAACTTCACCGAGACCGATATAAAGATGATGGAGCGCG-3'
 V202I (R): 5'-CGCGCTCCATCATCTTTATATCGGTCTCGGTGAAGTTC-3'
 M204I (F): 5'-GATGTGAAGATCATGAGCGCGTG-3'
 M204I (R): 5'-CACGCGCTCCATGATCTTACATC-3'
 V214I (F): 5'-GCAGATGTGCATCACCCAGTACC-3'
 V214I (R): 5'-GGTACTGGGTGATGCACATCTGC-3'
 K219Q (F): 5'-CAGTACCAGCAGGAGTCCCAGG-3'
 K219Q (R): 5'-CCTGGGACTCGCTGGTACTG-3'

4.3. Mutagénesis dirigida secuencial en dos pasos

Igual que en el apartado 2.3., partiendo de los plásmidos pOPIN E que expresan la PrP₂₃₋₂₃₁ de ratón, en este caso, se efectuaron mutagénesis dirigidas secuenciales de dos pasos. Para ello, además de los oligonucleótidos específicos para cada sustitución, se utilizaron los mismos dos oligonucleótidos que hibridan con el vector pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ de ratón, el *forward* cercano al extremo amino terminal y el oligonucleótido *reverse* cercano al extremo carboxilo terminal:

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

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

En un primer paso se realizaron dos PCRs, una de ellas con el oligonucleótido *forward* que contenía la mutación a introducir y el oligonucleótido *reverse* del extremo carboxilo terminal del gen que codifica la PrP; y la otra con el oligonucleótido *forward* del extremo amino terminal del gen que codifica la PrP y el oligonucleótido *reverse* que contiene la mutación. En todos los casos las PCRs fueron realizadas de forma idéntica a las del apartado 2.3. con:

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

También las condiciones de PCR se mantuvieron inalteradas, con un ciclo inicial de calentamiento a 95°C durante 5 min, a continuación, 40 ciclos de amplificación y finalmente, un periodo adicional de 10 min a 72°C. Cada ciclo de amplificación consistió en un periodo de desnaturalización de 95°C durante 20 s, seguido de un periodo de hibridación de 45 s a 56°C y finaliza con un periodo de 60 s a 72°C. 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 conejo con la mutación de interés. La purificación de los mismos se llevó a cabo mediante la utilización del kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante (*QIAquick® Spin Handbook*).

El segundo paso de la mutagénesis dirigida consistió en la reconstitución completa del gen que codifica la PrP de ratón conteniendo la mutación de interés. Para ello se realizó de nuevo una PCR igual que la del apartado 2.3., empleando como moldes los dos fragmentos obtenidos en el paso anterior y los oligonucleótidos *forward* y *reverse* que hibridan con el vector. En todos los casos y en esta última fase, las PCRs empleadas contenían:

- 50-100 ng fragmentos de ADN purificados de la primera fase.

- 50 ng de los oligonucleótidos *forward* y *reverse*.
- 1,25 unidades de la enzima *Pfu DNA Polymerase* (Fermentas).
- 5 µl del *buffer* 10X para la enzima *Pfu* (20mM MgSO₄).
- 0.4 µl de dNTP 10 mM.
- H₂O (hasta 50 µl).

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

4.4. Clonación de los genes que codifican las PrPs₂₃₋₂₃₁ de ratón con sustituciones de la PrP de conejo en el vector de expresión de proteínas pOPIN E

De forma idéntica a como se hizo para las sustituciones de ratón en la PrP de conejo, se llevaron a cabo las siguientes digestiones con enzimas de restricción y purificaciones con el fin de ligar los distintos fragmentos de ADN codificantes generados en el apartado anterior en el vector de expresión pOPIN E.

En primer lugar, los fragmentos de ADN que codifican la PrP₂₃₋₂₃₁ de ratón con cada mutación deseada se digirieron con la enzima de restricción *XbaI* (Fermentas) y posteriormente, tras realizar una purificación con *GeneJet PCR Purification Kit* (Fermentas), se digirieron con la enzima de restricción *PagI* (Fermentas), dando lugar a un fragmento de 1078 pares de bases. Los fragmentos digeridos se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v), tinción con EtBr 0,1% (p/v) y *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen), siguiendo el protocolo del fabricante.

El plásmido pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ de ratón fue digerido con las enzimas de restricción *XbaI* y *PagI*, siguiendo el procedimiento mencionado anteriormente. El fragmento de 4707 pares de bases fue purificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, tinción con EtBr 0,1% y *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante.

Los fragmentos correspondientes a las secuencias de los genes que codifican las PrPs₂₃₋₂₃₁ de ratón con las sustituciones de conejo fueron clonados en el vector pOPIN E de ratón obtenido en el paso anterior. Para ello, plásmido e inserto fueron mezclados en un ratio molar 3:1 (vector : inserto) y se efectuó la ligación mediante la enzima *T4 DNA ligasa* (Fermentas) incubando la mezcla reactiva a 16°C, como indica el protocolo del fabricante. Los productos de la ligación se transformaron en bacterias ultra-competentes *E. coli DH5 XL-Gold*[®] (Stratagene) siguiendo el protocolo estándar de transformación por choque térmico. De cada transformación se seleccionaron 4-6 colonias bacterianas y los plásmidos procedentes de estas colonias bacterianas se purificaron mediante *GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Para verificar que los plásmidos purificados tenían incorporado el gen que codifica la PrP₂₃₋₂₃₁ se realizó un análisis de restricción con las enzimas de restricción *XbaI* (Fermentas) y *PagI* (Fermentas) siguiendo el protocolo del fabricante. Finalmente, el gen que codifica la PrP₂₃₋₂₃₁ fue completamente secuenciado mediante el servicio de secuenciación de Stabvida con

el oligonucleótido universal T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'). A continuación se listan los plásmidos generados mediante la metodología detallada:

- pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ ratón N99G
- pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ ratón N107S
- pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ ratón L108M
- pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ ratón M137L
- pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ ratón W144Y
- pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ ratón N173S
- pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ ratón I183V
- pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ ratón V202I
- pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ ratón M204I
- pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ ratón V214I
- pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ ratón K219Q

5. Construcción de los plásmidos de expresión de las PrPs de conejo con sustituciones múltiples de la PrP de ratón

5.1. Selección de las mutaciones

Con la intención de saber si las mutaciones que más susceptible vuelven a la PrP de conejo al malplegamiento inducido por RML, S107N, M108L e I202V, podrían de forma conjunta o cooperativa eliminar totalmente la barrera interespecies entre ratón y conejo, se generaron variantes de PrP recombinante de conejo con múltiples sustituciones. Se decidió, por tanto, generar tres mutantes dobles con dos de las tres sustituciones y un triple mutante que incluye las tres sustituciones mencionadas en el contexto de la PrP recombinante de conejo. Así, en caso de que cualquier combinación de estas mutaciones determinase la existencia de la barrera interespecies existente entre ratón y conejo, su presencia combinada, aún en el contexto de la PrP recombinante de conejo, podría permitir la propagación de recRML en una sola ronda de rec-PMCA. A continuación se listan los mutantes que se decidieron generar:

- Conejo S107N M108L
- Conejo S107N I202V
- Conejo M108L I202V
- Conejo S107N M108L I202V

5.2. Diseño de oligonucleótidos

En este caso, resulta innecesario generar una pareja de oligonucleótidos por cada mutante que se planeó generar. Por una parte, porque las mutaciones S107N I202V y M108L I202V pueden generarse utilizando los

mismos oligonucleótidos diseñados para las mutaciones individuales pero utilizando como molde el plásmido que contiene la otra mutación (descritos en el apartado 2.4.), y por otra parte, porque el triple mutante también podría generarse de forma similar utilizando los oligonucleótidos diseñados para el doble mutante S107N M108L sobre el plásmido que contiene la mutación puntual I202V. A continuación se listan los oligonucleótidos utilizados, de los que sólo hubo que diseñar nuevos los que introducen la doble mutación S107N M108L que como son adyacentes no pueden aprovecharse los oligonucleótidos diseñados para cada mutación por separado.

S107N (F): 5'-GCCGAAAACCAACATGAAGCACGTGG-3'

S107N (R): 5'-CCACGTGCTTCATGTTGTTTTCGGC-3'

M108L (F): 5'-CCGAAAACCAGCTGGAAGCACGTGGC-3'

M108L (R): 5'-GCCACGTGCTTCAGGGCTGTTTTCGG-3'

S107N M108L (F): 5'-GCCGAAAACCAACCTGGAAGCACGTGG-3'

S107N M108L (R): 5'-CCACGTGCTTCAGGTTGTTTTCGGC-3'

5.3. Mutagénesis dirigida secuencial en dos pasos

Partiendo de los plásmidos pOPIN E que expresan la PrP₂₃₋₂₃₁ de conejo de genotipo salvaje o con la mutación puntual I202V descrita en el apartado 2.4., se efectuaron mutagénesis dirigidas secuenciales de dos pasos. Para ello, además de los oligonucleótidos descritos, se utilizaron dos oligonucleótidos que hibridan con una secuencia del vector pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ de conejo (tanto salvaje como con la mutación I202V) próxima al gen que codifica la PrP, un oligonucleótido *forward* cerca del extremo amino terminal y un oligonucleótido *reverse* cerca del extremo carboxilo terminal:

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

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

En un primer paso se realizaron dos PCRs, para cada uno de los mutantes múltiples de interés. Para el doble mutante N107S M108L se utilizaron por una parte, el oligonucleótido *forward* que contenía las dos mutaciones a introducir y el oligonucleótido *reverse* del extremo carboxilo terminal del gen que codifica la PrP; y por otra el oligonucleótido *forward* del extremo amino terminal del gen que codifica la PrP y el oligonucleótido *reverse* que contiene ambas mutaciones. Como molde de ambas reacciones se utilizó en este caso el pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ de conejo salvaje. Para los dobles mutante S107N I202V y M108L I202V se utilizaron por una parte, los oligonucleótidos *forward* que contenían la mutación S107N y la mutación M108L respectivamente y el oligonucleótido *reverse* del extremo carboxilo terminal del gen que codifica la PrP; y por otra el oligonucleótido *forward* del extremo amino terminal del gen que codifica la PrP y los oligonucleótidos *reverse* que contienen las mutaciones S107N y M108L respectivamente. Como molde de las 4 reacciones se utilizó en este caso el pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ de conejo I202V. Finalmente, para la generación del triple mutante, se utilizaron por una parte, el oligonucleótido *forward* que contenía las mutaciones N107S M108L y el oligonucleótido *reverse* del extremo

carboxilo terminal del gen que codifica la PrP; y por otra el oligonucleótido *forward* del extremo amino terminal del gen que codifica la PrP y el oligonucleótido *reverse* que contiene las mutaciones N107S M108L. Como molde para estas dos reacciones también se utilizó el pOPIN E PrP²³⁻²³¹ de conejo I202V. Así pues, en todos los casos y en esta primera fase, las PCRs empleadas contenían:

- 2 ng de plásmido de pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ de conejo salvaje o con mutación I202V.
- 50 ng de cada oligonucleótido.
- 1,25 unidades de la enzima *Pfu DNA Polymerase* (Fermentas).
- 5 µl del *buffer* (del inglés, tampón) 10X para la enzima Pfu (20mM MgSO₄).
- 0.4 µl de dNTP 10 mM.
- H₂O (hasta 50 µl).

Las condiciones de PCR aplicadas fueron idénticas a las descritas para los apartados anteriores. Un ciclo inicial de calentamiento a 95°C durante 5 min, 40 ciclos de amplificación y finalmente, 10 min a 72°C. Comprendiendo cada ciclo de amplificación de los siguientes pasos: desnaturalización a 95°C durante 20 s, hibridación a 45 s a 56°C y polimerización de 60 s a 72°C. 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 conejo con las mutaciones de interés. La purificación de los mismos se llevó a cabo mediante la utilización del kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante (*QIAquick® Spin Handbook*).

Para la reconstitución completa del gen que codifica la PrP de conejo conteniendo la mutación de interés, 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 con el vector. Igual que en anteriores apartados, las PCRs empleadas contenían:

- 50-100 ng 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).
- 5 µl del *buffer* 10X para la enzima Pfu (20mM MgSO₄).
- 0.4 µl de dNTP 10 mM.
- H₂O (hasta 50 µl).

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

5.4. Clonación de los genes que codifican las PrPs₂₃₋₂₃₁ de conejo con múltiples mutaciones en el vector de expresión de proteínas pOPIN E

Con el fin de ligar los distintos fragmentos de ADN codificantes generados en el apartado anterior en el vector de expresión pOPIN E, se llevaron a cabo las mismas digestiones con enzimas de restricción y purificaciones que se detallan en el apartado 2.4. y que se resumen a continuación.

En primer lugar, los fragmentos de ADN generados en el apartado anterior se digirieron con la enzima de restricción XbaI (Fermentas) y tras realizar una purificación con *GeneJet PCR Purification Kit* (Fermentas), se digirieron con la enzima de restricción PstI (Fermentas), dando lugar a un fragmento de 1078 pares de bases. Los fragmentos digeridos se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v), tinción con EtBr 0,1% (p/v) y *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen), siguiendo el protocolo del fabricante.

El plásmido pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ de conejo fue digerido con las enzimas de restricción XbaI y PstI, siguiendo el procedimiento mencionado anteriormente. Los fragmentos de 4707 pares de bases fueron purificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, tinción con EtBr 0,1% y *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante.

Los fragmentos correspondientes a las secuencias de las PrPs₂₃₋₂₃₁ de conejo con mutaciones múltiples fueron clonados en el vector pOPIN E de conejo obtenido en el paso anterior. Para ello, plásmido e inserto fueron mezclados en un ratio molar 3:1 (vector : inserto) y se efectuó la ligación mediante la enzima *T4 DNA ligasa* (Fermentas) incubando la mezcla reactiva a 16°C, como indica el protocolo del fabricante. Los productos de la ligación se transformaron en bacterias ultra-competentes *E. coli DH5 XL-Gold*[®] (Stratagene) y de cada transformación se seleccionaron 4-6 colonias bacterianas cuyos plásmidos se purificaron mediante *GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Para verificar que los plásmidos purificados tenían incorporado el gen que codifica la PrP₂₃₋₂₃₁ se realizó un análisis de restricción con las enzimas de restricción XbaI (Fermentas) y PstI (Fermentas) siguiendo el protocolo del fabricante. Finalmente, con el fin de asegurar que los plásmidos obtenidos contenían las mutaciones deseadas, el gen que codifica la PrP₂₃₋₂₃₁ fue completamente secuenciado mediante el servicio de secuenciación de Stabvida con el oligonucleótido universal T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'). A continuación se listan los plásmidos generados mediante la metodología detallada:

- pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ conejo S107N M108L
- pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ conejo S107N I202V
- pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ conejo M108L I202V
- pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ conejo S107N M108L I202V

6. Generación de las proteínas PrP recombinantes

6.1. Transformación de plásmidos en bacterias mediante choque térmico

Con el fin de producir las proteínas recombinantes de PrP completas (rPrP(23-231)), a partir de los plásmidos de expresión pOPIN E generados descritos en los apartados previos, los vectores fueron transformados

en bacterias súpercompetentes *E. coli Rosetta* (DE3)[™] (EMD Millipore), desarrolladas para mejorar la expresión de proteínas eucarióticas que contienen codones raramente usados en *E. coli*. Los plásmidos pOPIN E fueron transformados específicamente en estas bacterias mediante el protocolo estándar de transformación por choque térmico (Inoue, Nojima et al. 1990) y conservadas a -80°C en medio LB:glicerol 1:1 (v:v).

6.2. Expresión y purificación de las proteínas PrP recombinantes

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

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

El precipitado bacteriano se resuspendió en 50 ml de *buffer* de lisis (50 mM tris(hidroximetil)aminometano hidrocloreuro Tris-HCl (Fisher Bioreagents), 5 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Sigma-Aldrich), 1% Triton X-100 (Amresco), 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma-Aldrich), 100 µg/ml Lisozima (Sigma-Aldrich), pH ajustado a 8.0) y a continuación fue incubado durante 30 min en agitación a 200 rpm a temperatura ambiente en presencia de 100 U/ml de deoxyribonucleasa (DNAsa) (Sigma-Aldrich) y 20 mM de cloruro de magnesio (MgCl₂) (Sigma-Aldrich). El lisado fue centrifugado a 4°C durante 1 hora a una velocidad de 8500 *g* (Centrífuga Sorvall ST 16R, Thermo Scientific) y el material precipitado obtenido fue resuspendido en 50 ml de *buffer* de lavado (20 mM Tris-HCl (Fisher Bioreagents), 150 mM cloruro de sodio (NaCl) (Sigma-Aldrich), 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich), 1% Sarkosyl (Sigma-Aldrich), pH ajustado a 8.0). De nuevo, el lisado fue centrifugado en las condiciones anteriormente descritas y el material precipitado fue disuelto en 6 ml de *buffer* de inclusión (20 mM Tris-HCl (Fisher Bioreagents), 0.5 M NaCl (Sigma-Aldrich), 6 M cloruro de guanidina (GndCl)(Fisher Scientific), pH ajustado a 8.0) e incubado a 37°C en agitación durante toda la noche con el fin de disolver los cuerpos de inclusión y solubilizar al medio la proteína recombinante de interés. A continuación, las muestras fueron centrifugadas a 4°C durante 1 hora a una velocidad de 8500 *g* y los sobrenadantes fueron filtrados a través de un tamaño de poro de 0,20 µm (Minisart, Sartorius Stedim) antes de su purificación.

La purificación de las proteínas recombinantes fue llevada a cabo utilizando metodologías distintas en función de su posterior aplicación. Las proteínas utilizadas para la rec-PMCA se purificaron mediante cromatografía

de afinidad, mientras que las utilizadas en los estudios de Dicroísmo circular se purificaron primero mediante la misma técnica, seguida de diálisis para su plegamiento (se detalla el procedimiento de diálisis en el apartado 7) y una purificación adicional mediante cromatografía de gel filtración acoplado a un sistema de cromatografía líquida rápida de proteínas (del inglés, *Fast Protein Liquid Chromatography*, FPLC).

6.2.1. Purificación de las PrPs recombinantes mediante columnas de afinidad de histidinas

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

La calidad y pureza de las proteínas recombinantes obtenidas se evaluó mediante tinción de Coomassie tras electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) en geles *Criterion TGX 4-15%* (Bio-Rad) de 1-5 µg de la proteína recombinante. 10 µl de muestra de la elución de la proteína recombinante fueron precipitados añadiendo 56,7 µl de metanol frío (Fisher Chemical) y tras centrifugar durante 30 min a una velocidad de 19000 *g* y a 4°C de temperatura (Centrífuga Sorvall ST 16R, Thermo Scientific), el material precipitado fue resuspendido en 16 µl de *buffer NuPAGE* (Invitrogen Life Technologies) y fue cargado en el gel de electroforesis. El gel se incubó durante una hora en *buffer* de tinción de Coomassie (3 g Coomassie Brilliant Blue®, Serva), 450 ml metanol (Fisher chemical), 50 ml ácido acético glacial (Fisher chemical) y 450 ml de H₂O destilada). La decoloración del mismo se realizó con el *buffer* conteniendo 200 ml metanol, 50 ml ácido acético glacial y 250 ml H₂O destilada, cambiando el *buffer* cada 30 min durante aproximadamente tres horas.

6.2.2. Post-purificación de las PrP recombinantes mediante gel filtración acoplado a un sistema de FPLC

En el caso de las PrP recombinantes utilizadas para el estudio de la propensión a adquirir conformación estado-β frente al tratamiento con agentes caotrópicos seguido por Dicroísmo circular (descrito en el apartado 8 de Resultados), se requiere una mayor pureza y homogeneidad de las mismas, por lo que se les aplicó una post-purificación. Este procedimiento de purificación de proteínas está basado en el uso de una columna

cromatográfica de gel filtración (*HiLoad 16/600 Superdex 75pg* (GE Healthcare)) acoplada a un sistema de FPLC (AKTÄ™ (GE Healthcare)), a la que se sometieron las PrPs recombinantes de hámster, ratón, conejo y conejo I202V.

En estos casos, la expresión de proteínas se lleva a cabo exactamente igual a lo descrito en el apartado previo. Sin embargo, la purificación difiere en que una vez eluidas y desnaturalizadas mediante la adición GndCl (Sigma-Aldrich) hasta una concentración final de 6 M, no se concentran como el resto a 4-5 mg/ml. En cambio, se concentran hasta un volumen final de 10-12 ml (*Amicon Ultra-15 10 KDa Centrifugal filter unit* (Millipore)) y se dializan directamente empleando una membrana de diálisis de 10 KDa, (*SnakeSkin™ Dialysis Tubing 10K MWCO 22mm*, Thermo-Pierce) durante 6-8 horas a 4°C frente a *buffer* de PBS (del inglés, *Phosphate Buffered Saline*, PBS) (Fisher Bioreagents) con 2 M de GndCl. Después se cambia el *buffer* a PBS sin GndCl, frente al cual la proteína se dializa durante otras 6-8 horas a 4°C. De ahí se pasa a *buffer* PBS con el pH ajustado a 6 con HCl para seguir la diálisis durante otras 6-8 horas 4°C y finalmente se dializa en *buffer* de Acetato sódico a pH 4 (5mM acetato sódico (Sigma-Aldrich), 67 mM NaCl (Sigma-Aldrich), 5 mM EDTA (Sigma-Aldrich)). Con el fin de descartar la proteína recombinante insoluble, el producto de la diálisis es centrifugado a una velocidad de 19.000 g durante 15 minutos y a 4 °C de temperatura (Centrífuga Sorvall ST 16R, Thermo Scientific) y el sobrenadante filtrado a través de un filtro con tamaño de poro de 0.20µm (Minisart, Sartorius Stedim). Durante todo el proceso se mantiene la proteína en hielo o a 4 °C.

Una vez filtrada la proteína dializada y previo a su paso por la columna de gel filtración con el mismo *buffer* de Acetato sódico a pH 4 utilizado durante el último paso de diálisis, éste debe ser filtrado y desgasado, mediante un filtro con poro de 0.22 µm (*Corning® filter system* (Sigma-Aldrich)) acoplado a una bomba de vacío (Vacum-pres., JP Selecta) y con agitación magnética.

Una vez con el *buffer* filtrado y desgasado, la columna de gel filtración se equilibra con 1.2 volúmenes de columna del *buffer* de acetato sódico a pH 4 y a continuación se inyecta la proteína. La cromatografía se realiza a un flujo constante del *buffer* de 1-2 ml/min controlando los parámetros mediante el software Unicorn Manager (Amersham Biosciences), hasta la elución de toda la proteína (aproximadamente 1.5 volúmenes de columna). Las fracciones resultantes de la elución en las que se detecta proteína mediante la medida de la absorbancia del eluido a 280 nm, se recolectan y mezclan para una posterior concentración de la muestra mediante unidades de filtros de centrifugación de 10 KDa, (*Amicon Ultra-15 10 KDa Centrifugal filter unit* (Millipore)), hasta un volumen final de 1-2 ml que se conservan a 4°C hasta un máximo de 3 días.

7. Preparación de sustratos para PMCA

Con el objetivo de realizar distintos experimentos utilizando la técnica de PMCA, se prepararon distintos tipos de sustratos basados o bien en PrP recombinante o bien en homogenizados completos de encéfalo, que

contienen la PrP completa, incluyendo glicosilaciones y anclaje a membrana mediante GPI. Durante todo el proceso de la preparación de estos sustratos, todos los componentes han sido mantenidos a 4°C con el fin de mantener la estabilidad de los mismos. Tras haber preparado los sustratos, estos fueron conservados a -80°C en alícuotas idóneas para evitar ciclos de congelación-descongelación, dado que este proceso favorece la degradación de la PrP.

7.1. Sustratos basados en homogeneizados completos de encéfalo

Los encéfalos de ratones de diverso origen fueron extraídos tras sacrificar los animales mediante inhalación de dióxido de carbono (CO₂) y tras ser perfundidos mediante punción cardiaca con 50 ml de *buffer* de perfusión (PBS (HyClone -Ca, -Mg) 5 mM EDTA (Sigma-Aldrich)). El objetivo de este procedimiento es eliminar restos de sangre que pudieran afectar negativamente tanto al proceso de amplificación de priones, como al tratamiento posterior con PK. La homogenización se lleva a cabo con la ayuda de un homogeneizador de tejidos Elvehjem de 15 ml (Fisherbrand), empleando un *buffer* de conversión (CB, del inglés, *Conversion Buffer*) frío (PBS (Fisher BioReagents), 150 mM NaCl (Sigma-Aldrich), 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich), 4 mM EDTA (Sigma-Aldrich), inhibidores de proteasas *Complete™ Cocktail 1X* (Roche)) al 10% (p/v) y manteniendo la muestra a 4°C a lo largo de todo el proceso. Los encéfalos utilizados en esta tesis doctoral provienen de la siguiente línea de ratón:

- **TgRab:** Ratones transgénicos que expresan la PrP^C de conejo de genotipo salvaje, sin presencia de la PrP^C murina endógena. El nivel de expresión de PrP en estos animales es de 5-6x respecto al nivel de expresión de PrP^C endógena en conejo y 10-12x respecto al nivel de expresión de la PrP endógena murina. (Vidal, Fernandez-Borges et al. 2015)

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

Las proteínas recombinantes purificadas a través de columnas de afinidad, tal y como se describe en el apartado 6.2.1., se diluyen 1:5 en PBS (Fisher Bioreagents) y se dializan frente a PBS durante 1 h a 4°C empleando casetes de diálisis de 10 KDa (*Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette 10K MWCO*, Thermo Scientific). Con el fin de eliminar la proteína insoluble anormalmente plegada como consecuencia del proceso de diálisis, las muestras se centrifugan a 19.000 g durante 15 min a 4°C (Centrífuga Sorvall ST 16R, Thermo Scientific) y se recoge el sobrenadante que contiene la proteína soluble plegada.

Con el objetivo de complementar los sustratos con factores que fomentan la amplificación de priones se emplean encéfalos de ratones transgénicos carentes de PrP (ratones transgénicos *PRNP^{-/-}* (Bueler, Fischer et al. 1992)) o encéfalos procedentes de pollo (*Gallus gallus domesticus*), cuya proteína PrP no interfiere en el fenómeno de amplificación de priones por no ser convertible. El uso de sustratos complementados con encéfalo de pollo, responde a la observación de que presenta mayor eficiencia de propagación por dilución seriada de inóculo que los

sustratos complementados con encéfalo de ratón *PRNP*^{-/-}, reservándose su uso para los estudios de dilución principalmente.

En el caso de la utilización de encéfalos de ratones transgénicos *PRNP*^{-/-}, tras el sacrificio de los animales, los encéfalos fueron perfundidos con el *buffer* de perfusión tal como se describe en el apartado 7.1. En el caso de los encéfalos de pollo, dada la complejidad de llevar a cabo la perfusión descrita anteriormente, tras el sacrificio del animal se realizó un lavado del tejido en el *buffer* de perfusión, eliminando la mayor fracción de sangre posible. Los encéfalos obtenidos se homogenizan al 10% (p/v) en *buffer* de conversión manteniendo la muestra a 4°C a lo largo de todo el proceso. Con el fin de eliminar restos de tejido no homogeneizados correctamente la muestra se centrifuga a 19.000 g durante 15 min a 4°C (Centrífuga Sorvall ST 16R, Thermo Scientific) y el precipitado es descartado.

Finalmente la PrP recombinante previamente cuantificada por *BCA Protein Assay* (Thermo-Pierce)) para conseguir una concentración final aproximada de 50-100 ng/μl, fue mezclada para su complementación con el homogenizado de encéfalo en una proporción 1:10 (PrP recombinante : encéfalo). Durante el proceso de preparación de estos sustratos, los componentes se mantienen a 4°C con el fin de mantener la estabilidad de los mismos y posteriormente son congelados a -80°C en alícuotas idóneas para evitar ciclos de congelación y descongelación.

8. Cepas de priones

Durante la realización de esta tesis doctoral se han empleado un gran número de cepas de priones como inóculos en PMCA, con distintos orígenes y características que se detallan en la tabla 1.

Tabla 2. Listado de las distintas cepas de príon utilizadas en este trabajo. En la columna de Inóculo se utiliza la denominación más habitual para cada cepa, o en su defecto (como en caso de las cepas experimentales obtenidas por PMCA) el nombre asignado que hace referencia a la especie actual y la de origen, que es también la que se utiliza en este trabajo. En características se definen la especie original de la que proviene el aislado natural del inóculo; la especie actual, que es aquella de la que se ha obtenido el inóculo utilizado finalmente y la procedencia, que especifica si se trata de un inóculo obtenido directamente de encéfalo de animales afectados (Encéfalo), adaptado previamente a PMCA basada en homogenizado de encéfalo (PMCA) o adaptado previamente a PrP recombinante mediante rec-PMCA (rec-PMCA). La columna de Fuente, hace referencia al laboratorio del que se ha obtenido. En la columna de Referencias se muestra una publicación científica por inóculo en la que se puede ampliar la información sobre sus características y origen. ND: no descrito mediante publicación científica.

Inóculo	Características			Fuente	Referencia
	Especie de origen	Especie actual	Tipo (Procedencia)		
RML	Oveja	Ratón	Encéfalo	Dr. Tomás Mayoral (LCV, Madrid)	Chandler 1961
ME7	Oveja	Ratón	Encéfalo	Dr. Francesca Chianini (Moredun, Edimburgo)	Dickinson 1969
CWD	Ciervo mula	Ciervo mula	Encéfalo	Dr. Jean E. Jewell (University of Wyoming)	Williams 1992

BSE	Vaca	Vaca	Encéfalo	Dr.Tomás Mayoral (LCV, Madrid)	Wilesmith 1988
sheepBSE	Vaca	Oveja	Encéfalo	Dr Olivier Andreoletti (INRA, Toulouse, Francia)	Foster 1994
SSBP/1	Oveja	Oveja	Encéfalo	TSE Resource Centre	Stack 2002
<i>De novo</i> RaPrP ^{Sc}	Conejo	Conejo	Encéfalo	Dr. Joaquín Castilla (CIC bioGUNE, Bilbao)	Chianini 2012
Conejo-RML	Oveja	Conejo	PMCA	Dr. Joaquín Castilla (CIC bioGUNE, Bilbao)	Chianini 2012
Conejo -ME7	Oveja	Conejo	PMCA	Dr. Joaquín Castilla (CIC bioGUNE, Bilbao)	Chianini 2012
Conejo -CWD	Ciervo mula	Conejo	PMCA	Dr. Joaquín Castilla (CIC bioGUNE, Bilbao)	Chianini 2012
Conejo -BSE	Vaca	Conejo	PMCA	Dr. Joaquín Castilla (CIC bioGUNE, Bilbao)	Chianini 2012
Conejo - <i>De novo</i> RaPrP ^{Sc}	Conejo	Conejo	PMCA	Dr. Joaquín Castilla (CIC bioGUNE, Bilbao)	Chianini 2012
recRatón-RML-SuperHigh	Ratón	Ratón (rec)	rec-PMCA	Dr. Joaquín Castilla (CIC bioGUNE, Bilbao)	ND
recRatón-RML	Ratón	Ratón (rec)	rec-PMCA	Dr. Joaquín Castilla (CIC bioGUNE, Bilbao)	Tesis SRE

Las cepas previamente adaptadas a PMCA o rec-PMCA fueron obtenidas en el laboratorio de la siguiente forma. Cada una de las cepas de priones fue mezclada 1:10 (v/v) con un homogenizado al 10% en CB de encéfalo que expresa la PrP de interés o de sustrato con la PrP recombinante de interés y se realizaron 10-15 rondas seriadas 1:10 (v/v) manteniendo las características de cada una de las cepas de inicio al menos en el caso de las PMCAs con homogenizados de encéfalo (Castilla, Morales et al. 2008). Todas las cepas, tanto las provenientes de homogenizados de encéfalo como las previamente adaptadas a PMCA o rec-PMCA se conservan a -80°C.

9. Propagación *in vitro* de priones mediante PMCA

La propagación *in vitro* de priones fue realizada basándose en el procedimiento de PMCA descrito por Castilla y colaboradores (Saborio, Permanne et al. 2001, Castilla, Saa et al. 2005, Saa, Castilla et al. 2006) que permite replicar priones *in vitro* mimetizando la replicación *in vivo*, pero con una cinética más acelerada (Saborio, Permanne et al. 2001).

Todos los experimentos de PMCA se llevaron a cabo utilizando tubos eppendorf de 0.2 ml y de pared fina (Fisherbrand) para favorecer una penetración más efectiva de las ondas ultrasónicas. Los volúmenes finales empleados fueron de 50 – 100 µl dependiendo del tipo de experimento y del sustrato empleado.

El modelo de sonicador utilizado y los parámetros empleados durante la sonicación son específicos en función del tipo de sustrato, descritos en el apartado 7, que se emplea para la propagación de priones *in vitro*:

- **Sustratos basados en PrP recombinante:** se utiliza el sonicador Misonix Q-700 con sistema de microplaca (Qsonica) programado para llevar a cabo ciclos de 30 minutos de incubación, seguidos de pulsos de sonicación de 15 s a una potencia de 50-60%. Todo el proceso fue llevado a cabo a una temperatura media de 39°C regulada mediante un baño de agua circulante.
- **Sustratos basados en PrP^C de encéfalo:** se utilizó el sonicador Misonix S-4000 con sistema de microplaca (Qsonica) programado para efectuar ciclos de 30 minutos de incubación, seguidos de pulsos de 20 s de sonicación a una potencia de 80%. Todo el proceso fue llevado a cabo a una temperatura media de 37°C regulada mediante un baño de agua circulante.

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

Estudio de las barreras de especie y de propagación persistente de los priones. A lo largo de esta tesis doctoral, se ha estudiado la capacidad *in vitro* de los priones para adaptarse a una nueva especie o variante de PrP y para ello se llevaron a cabo rondas sucesivas de PMCA en las que las cepas de prión se diluyeron 1:10 en el sustrato de interés. Tras un ciclo de 24 horas de PMCA se realizó una dilución 1:10 del producto de la primera ronda de PMCA en sustrato fresco y el proceso se repitió hasta un total de 10-20 rondas de PMCA. En cada experimento de este tipo se incluyeron múltiples réplicas de cada muestra, entre 4 y 6 en este caso, ya que debido a la estocasticidad que presenta la PMCA, no en todos los duplicados aparece PrP^{res} ni lo hace en el mismo número de ronda de PMCA. Es por ello que para evaluar barreras de transmisión se utilizan tantas réplicas como sea posible, como control de la variabilidad intrínseca de la PMCA. Así mismo, se incluyó el mismo número de tubos sin semilla inicial en cada ronda, como control de aparición espontánea o de contaminaciones cruzadas.

Capacidad de amplificación de un prión mediante diluciones seriadas. Una de las características que define una cepa de prión es su capacidad de replicarse en un sustrato mediante PMCA, por ello se llevaron a cabo PMCA en las que empleando el mismo sustrato, se realizaron diluciones seriadas del inóculo en estudio (entre 10^{-1} y 10^{-10}) y se estableció la capacidad de propagación del mismo mediante determinación de la dilución máxima del inóculo a la que la señal de PrP^{res} es visible después de la ronda de PMCA. Este tipo de PMCA consistió en una única ronda de PMCA de 48 horas y la homogeneidad del resultado se garantizó mediante el empleo de bolitas de zirconia y silica de 1 mm de diámetro (BioSpec Products) (Fernandez-Borges, de Castro et al. 2009). En aquellos

casos en que se desconoce la capacidad de propagación de un determinado inóculo, se incluyó también un control inoculado a la misma dilución mínima que la utilizada para el experimento, que no fue sometido a PMCA, sino que se congeló inmediatamente. Este control, denominado no amplificado (NA), permite distinguir la señal de PrP^{res} correspondiente al inóculo inicial de la señal de PrP^{res} debida a la propagación de ese mismo inóculo.

10. Estudios bioquímicos de los priones

10.1. Estudio de resistencia de los priones a la digestión con proteinasa K (PK)

La resistencia a PK, característica de la PrP^{res}, se evalúa en todos los casos incubando las muestras durante 1 hora a 42°C y a una agitación constante de 450 rpm (Thermomixer confort, Eppendorf).

Las concentraciones de PK (Roche) empleadas se adaptaron al tipo de muestra en estudio, de modo que en las muestras en las que la PrP del sustrato era recombinante, la concentración de PK final necesaria fue de 25 µg/ml, mientras que si el sustrato se basaba en homogenizado de encéfalo completo, la digestión se llevaba a cabo con 50-100 µg/ml de PK. Del mismo modo, con el objetivo de mejorar la reacción de digestión se diluyeron las muestras con diferentes detergentes (*buffer* de digestión): Dilución 1:2 en PBS con 10% de sarkosyl (Sigma-Aldrich) en el caso de muestras con PrP recombinante y dilución 1:10 en PBS con 2% de Tween-20 (Sigma-Aldrich) + 2% de Nonidet P40 (Sigma-Aldrich) en el caso de PrP^C de encéfalo. En todos los casos, la digestión se detuvo mediante la adición de *buffer* de carga *NuPAGE* (Invitrogen Life Technologies).

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

Para el estudio de resistencia a PK que se presenta en el apartado 5 de Resultados, las condiciones de digestión son idénticas a las descritas anteriormente, pero una misma dilución de PrP^{res} en *buffer* de digestión se dividió para digerir con concentraciones de PK de 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 y 3200 µg/ml.

10.2. Detección de proteínas mediante la técnica de *Western blot* (WB)

La inmunodetección de proteínas mediante la metodología de *Western blot* (WB) se lleva a cabo tras la separación proteica mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). En función de la naturaleza de la muestra se eligió un sistema de electroforesis u otro, de modo que en muestras procedentes de PMCA recombinante se optó generalmente por el sistema *Criterion TGX gel 4-15%* (Bio-Rad) y en el caso de muestras procedentes de PMCA empleando PrP^C de encéfalo se utilizó generalmente *NuPAGE Midi gel 4-12%* (Invitrogen Life Technologies). Del mismo modo, el sistema de transferencia se adaptó al sistema de electroforesis empleado, seleccionando membranas adsorbentes de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (*Trans-Blot Turbo Transfer Pack PVDF*, Bio-Rad) y

electrotransferencia con el equipo *Trans Blot Turbo System* (Bio-Rad) en el caso de muestras procedentes de PMCA recombinante y membranas de nitrocelulosa (Protran BA85, GE Healthcare) y electrotransferencia con el equipo *Trans-blot Cell* (Bio-Rad) en el caso de PMCA empleando PrP^c de encéfalo. Tras bloquear las membranas con leche deslipidada al 5% y Tween-20 0,05% en PBS durante 1 hora, se procedió a la inmunodetección con el anticuerpo primario Saf84 (1:400, Cayman Chemical) en el caso de especificidad a PrP de conejo con o sin mutaciones, Saf83 (1:400, Cayman Chemical) en el caso de la PrP de ratón con o sin mutaciones y 12B2 (1:2.500, Central Veterinary Institute) en el caso de querer detectar en una misma membrana PrP de tanto de conejo como de ratón. En todos los casos se utilizó el anticuerpo secundario policlonal conjugado con peroxidasa de rábano *Goat anti-mouse IgG-HRP* (1:3.000, Santa Cruz Biotechnology). Tras la incubación con cada anticuerpo durante 1 hora a temperatura ambiente se realizaron lavados con una solución de PBS y tween-20 al 0,2%. Finalmente, las bandas inmunoreactivas se revelaron por quimioluminiscencia empleando el kit *Super Signal West Pico* (Thermo Scientific Pierce) y la visualización de imágenes digitales se llevó a cabo mediante el equipo *FluorChem Q* (Alpha Innotech) y el software AlphaView (Alpha Innotech).

10.3. Cuantificación de bandas inmunoreactivas de PrP^{res}

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

11. Análisis comparativo de la propensión a adquirir conformación estado- β de las PrP recombinantes frente al tratamiento con agentes caotrópicos seguido por Dicroísmo circular

Tras la post-purificación descrita en el apartado 6.2.2., la concentración de PrP recombinante se midió a través de la medida de absorbancia a 280 nm en *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific), y se diluyó en buffer de acetato sódico a pH 4 igual al descrito en el apartado 6.2.2. pero sin EDTA, hasta una concentración de 20.4 μ M para aquellas que se incubaron con GndCl (Sigma-Aldrich) (de 0 a 4 M) y hasta una concentración de 39.4 μ M para aquellas que se incubaron con Urea (Sigma Aldrich) (de 0 a 8 M). Se prepararon también soluciones stock de acetato sódico pH4 a 1M, NaCl a 6 M y GndCl y urea a 9.25 M. La solución de urea se trató con *Amberlite* (Sigma-Aldrich), ya que las soluciones de urea tienden a dar lugar a iones reactivos de cianato, que podrían interferir en el estudio.

Con las soluciones stock y las PrPs preparadas a concentraciones adecuadas, se prepararon 30 muestras de cada PrP a concentraciones de GndCl que van desde 0 a 4 M o de urea que van desde 0 a 8 M siguiendo los cálculos que se muestran en las tablas 2 y 3. Así, se consiguieron 30 muestras con una concentración final de 10 μ M de PrP recombinante para el caso del GndCl y 5 μ M en el caso de la urea, con concentraciones crecientes de ambos agentes caotrópicos en un *buffer* de acetato sódico a 5 mM con NaCl a 67 mM.

Tabla 3. Cálculo del volumen necesario de cada solución stock en la preparación de muestras para evaluar la propensión a adquirir estado- β de una PrP recombinante ante la desnaturalización con Urea.

Muestra	Urea (M)	Urea 9,25M (μ l)	H ₂ O (μ l)	Acetato 1M (μ l)	NaCl 6M (μ l)	PrP 39.4 μ M (μ l)
1	0.00	0.00	562.17	1.66	3.69	82.48
2	0.50	35.14	527.03	1.66	3.69	82.48
3	1.00	70.27	491.90	1.66	3.69	82.48
4	1.50	105.41	456.76	1.66	3.69	82.48
5	2.00	140.54	421.63	1.66	3.69	82.48
6	2.50	175.68	386.49	1.66	3.69	82.48
7	2.73	191.65	370.52	1.66	3.69	82.48
8	2.97	208.37	353.80	1.66	3.69	82.48
9	3.20	225.09	337.07	1.66	3.69	82.48
10	3.44	241.82	320.35	1.66	3.69	82.48
11	3.68	258.54	303.62	1.66	3.69	82.48
12	3.92	275.27	286.90	1.66	3.69	82.48
13	4.16	291.99	270.17	1.66	3.69	82.48
14	4.39	308.72	253.45	1.66	3.69	82.48
15	4.63	325.44	236.73	1.66	3.69	82.48
16	4.87	342.17	220.00	1.66	3.69	82.48
17	5.11	358.89	203.28	1.66	3.69	82.48
18	5.35	375.61	186.55	1.66	3.69	82.48
19	5.58	392.34	169.83	1.66	3.69	82.48
20	5.82	409.06	153.10	1.66	3.69	82.48
21	6.06	425.79	136.38	1.66	3.69	82.48
22	6.30	442.51	119.65	1.66	3.69	82.48
23	6.54	459.24	102.93	1.66	3.69	82.48
24	6.77	475.96	86.21	1.66	3.69	82.48
25	7.01	492.68	69.48	1.66	3.69	82.48
26	7.25	509.41	52.76	1.66	3.69	82.48
27	7.49	526.13	36.03	1.66	3.69	82.48
28	7.73	542.86	19.31	1.66	3.69	82.48
29	8.00	562.16	0.00	1.66	3.69	82.48

Tabla 4. Cálculo del volumen necesario de cada solución stock en la preparación de muestras para evaluar la propensión a adquirir estado- β de una PrP recombinante ante la desnaturalización con cloruro de Guanidina.

Muestra	GndCl (M)	GndCl 8M (μ l)	H ₂ O (μ l)	Acetato 1M (μ l)	NaCl 6M (μ l)	PrP 20.4 μ M (μ l)
1	0,00	0,00	160,36	0,82	1,82	157
2	0,14	5,52	154,85	0,82	1,82	157
3	0,28	11,03	149,33	0,82	1,82	157
4	0,41	16,55	143,81	0,82	1,82	157

5	0,55	22,07	138,30	0,82	1,82	157
6	0,69	27,59	132,78	0,82	1,82	157
7	0,83	33,10	127,26	0,82	1,82	157
8	0,97	38,62	121,74	0,82	1,82	157
9	1,10	44,14	116,23	0,82	1,82	157
10	1,24	49,66	110,71	0,82	1,82	157
11	1,38	55,17	105,19	0,82	1,82	157
12	1,52	60,69	99,68	0,82	1,82	157
13	1,66	66,21	94,16	0,82	1,82	157
14	1,79	71,72	88,64	0,82	1,82	157
15	1,93	77,24	83,12	0,82	1,82	157
16	2,07	82,76	77,61	0,82	1,82	157
17	2,21	88,28	72,09	0,82	1,82	157
18	2,34	93,79	66,57	0,82	1,82	157
19	2,48	99,31	61,05	0,82	1,82	157
20	2,62	104,83	55,54	0,82	1,82	157
21	2,76	110,34	50,02	0,82	1,82	157
22	2,90	115,86	44,50	0,82	1,82	157
23	3,03	121,38	38,99	0,82	1,82	157
24	3,17	126,90	33,47	0,82	1,82	157
25	3,31	132,41	27,95	0,82	1,82	157
26	3,45	137,93	22,43	0,82	1,82	157
27	3,59	143,45	16,92	0,82	1,82	157
28	3,72	148,97	11,40	0,82	1,82	157
29	3,86	154,48	5,88	0,82	1,82	157
30	4,00	160,00	0,36	0,82	1,82	157

Las muestras preparadas según las tablas de cálculos, se incubaron durante al menos 5 días a temperatura ambiente antes de tomar las medidas por DC. Las medidas se realizaron en un espectropolarímetro Jasco J-810 (Jasco) utilizando una cubeta de cuarzo de 2 mm (Suprasil 110-QS, 2mm, Hellma Analytics) a 25°C. Para todas las muestras se midió el espectro de DC desde 280 a 198 nm, con 2 acumulaciones por cada muestra, a 4 segundos, 0.2 nm de *data pitch*, con un ancho de banda de 4 nm y una velocidad de escaneo de 20 nm/s. Las medidas a 220 y 229nm para cada concentración de agente caotrópico se utilizaron para dibujar las curvas de desnaturalización a distintos pH. A partir de estos se calcularon las fracciones de cada PrP recombinante que adquieren conformación estado- β , utilizando las fórmulas que se presentan en el apartado 10 de Resultados.

Los cambios de pH para cada proteína se hicieron mediante diálisis de la PrP recombinante post-purificada sobrante, dializándola en un casete de 10 KDa (*Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette 10K MWCO*, Thermo Scientific), frente al nuevo buffer de acetato sódico a pH 4.5 o a pH 5, a 4°C y durante 8 horas.

RESULTADOS

1. Malplegamiento sin éxito de la proteína priónica recombinante de conejo *in vitro* mediante inoculación con cepas de diversa procedencia

Para el estudio de los mecanismos moleculares que rigen la susceptibilidad de una determinada PrP mediante el uso de proteínas recombinantes y PMCA, es necesario obtener primero PrP^{res} recombinantes con capacidad de inducir malplegamiento en otras PrP recombinantes. El malplegamiento de PrP recombinante puede darse *in vitro* de dos maneras: 1) De forma espontánea, a través de rondas seriadas de rec-PMCA en que esporádicamente puede formarse PrP^{res} con la capacidad de inducir malplegamiento si se utiliza como semilla en posteriores reacciones o 2) Mediante la adición al sustrato de reacción que contiene la PrP recombinante, de una semilla consistente en priones provenientes de aislados naturales o experimentales, así como de cepas obtenidas *in vitro* en PMCA o rec-PMCA previamente.

En el caso de los lepóridos, la supuesta resistencia a las enfermedades priónicas que se les adjudicó durante décadas, pudo refutarse recientemente gracias a la obtención de priones de conejo mediante pases seriados en PMCA, utilizando homogenizado de encéfalo de conejo como sustrato. La inoculación de algunas de estas cepas priónicas generadas *in vitro*, produjo una clara encefalopatía espongiiforme en conejos inoculados intracerebralmente. Los tiempos de incubación resultaron muy prolongados respecto a otras especies, lo cual impidió el cálculo de la tasa real de infección que es aparentemente baja, posiblemente debido a que el tiempo de incubación excede el de vida media del animal (Chianini, Fernandez-Borges et al. 2012). Así pues, a pesar de haberse demostrado su susceptibilidad, esta parece ser particularmente baja dados los largos tiempos de incubación que mostraron los animales infectados experimentalmente y teniendo en cuenta la ausencia de casos descritos en la naturaleza.

Tras conseguirse también con éxito la generación de priones recombinantes infecciosos a través de la rec-PMCA en otras especies como topillo rojo, ratón, hámster u oveja (ref. tesis SER y CHF), se decidió tratar de obtener priones recombinantes de conejo mediante el mismo método. Para ello, como se detalla en el apartado 6 de Materiales y Métodos, la PrP recombinante de conejo expresada en *E. coli*, purificada y plegada mediante diálisis, se complementó con homogenizado de encéfalo de ratón *PRNP*^{-/-} para generar el sustrato de la reacción. El aporte al sistema *in vitro* de gran parte de los factores entre los que se encuentra en condiciones fisiológicas la proteína priónica, ha demostrado en experimentos

previos con otras especies que favorece el malplegamiento de la PrP recombinante en rec-PMCA, a pesar de no ser estrictamente necesario para tal objetivo (ref. tesis SRE).

Inicialmente, y como en el caso de otras especies cuyas PrP recombinantes pudieron ser malplegadas mediante pases seriados en rec-PMCA, se escogieron diversas cepas de priones provenientes de encéfalos homogenizados de animales afectados. Utilizamos los inóculos listados en la primera parte de la Tabla 1 cuya elección se basó en múltiples criterios. Por una parte, se eligieron aquellas que pudieron malplegar homogenizado de encéfalo de conejo en PMCA previamente, dando lugar a priones capaces de infectar conejos *in vivo* en algunos casos (Chianini, Fernandez-Borges et al. 2012). Además, se tuvo en cuenta la relevancia que tienen dichas cepas en la naturaleza, siendo de las más extendidas en animales que cohabitan con conejos y por consiguiente con mayores probabilidades de ser transmitidas a lepóridos, como el scrapie y la EEB en ovinos y bóvidos respectivamente en Europa o la EDC en cérvidos en Estados Unidos y Canadá ((Jeffrey and Gonzalez 2007), (Bradley, Collee et al. 2006), (Saunders, Bartelt-Hunt et al. 2012)). La elección de cepas de scrapie previamente transmitidas a modelos murinos responde al mayor conocimiento que se tiene de las mismas en modelos experimentales tanto *in vitro* como *in vivo* además de la cercanía entre ambas especies de roedores, que podría influir en la barrera de transmisión. También con la idea de reducir en la medida de lo posible la barrera de transmisión interespecies, se escogió el inóculo generado *de novo* previamente mediante pases seriados de PMCA en homogenizado de encéfalo de conejo sin semilla y que como ya se ha mencionado, resultó infeccioso en conejos *in vivo* (Chianini, Fernandez-Borges et al. 2012).

Tal y como se detalla en el apartado 9 de Materiales y Métodos, se realizaron 20 pases seriados en rec-PMCA con cada una de las semillas provenientes de homogenizados de encéfalos de animales afectados en sustrato de rec-PMCA que contenía la PrP recombinante de conejo. La inoculación inicial se realizó diluyendo cada semilla 1:10 en el sustrato y tras cada ronda de 24 horas de PMCA se iniciaba la siguiente diluyendo también 1:10 el producto de la ronda anterior de PMCA en sustrato fresco. Cada cepa se utilizó como semilla por sextuplicado (duplicados intraexperimentales) y se incluyó el mismo número de tubos sin semilla inicial en cada ronda, como control de aparición espontánea o de contaminaciones cruzadas.

Ante la ausencia de aparición de PrP^{res} mediante adición como semilla de diversas cepas de priones provenientes de encéfalos de animales afectados y pases seriados en rec-PMCA, se optó por tratar de obtener priones recombinantes de conejo con inóculos previamente generados por PMCA en homogenizados de encéfalo de conejo. Así, se pretendía facilitar el malplegamiento de la proteína

recombinante de conejo con semillas que, además de no presentar barrera interespecies al tener la misma secuencia aminoacídica que la PrP recombinante, están adaptados al sistema de propagación *in vitro* a diferencia del grupo anterior. Concretamente, tal y como se muestra en la segunda parte de la Tabla 1, se escogieron todas las cepas disponibles del primer grupo de inóculos que habían propagado el malplegamiento en el homogenizado de encéfalo de conejo y fueron utilizadas posteriormente para las inoculaciones *in vivo*.

Igual que con el grupo anterior y a pesar de redoblar esfuerzos realizando dos intentos de 20 rondas seriadas de rec-PMCA para cada semilla (duplicados interexperimentales), tampoco pudimos obtener PrP recombinante de conejo malplegada a una conformación resistente a PK con ninguno de los inóculos utilizados.

Finalmente, se pensó que la obtención directa de priones recombinantes de conejo mediante adición de semilla y rondas seriadas en rec-PMCA podría verse impedida por las diferencias existentes entre la PrP recombinante y la proveniente del encéfalo homogenizado. Tal y como se detalla en el apartado 4.2.1. de la Introducción, a diferencia de la PrP de encéfalo, la recombinante carece de glicosilaciones así como del GPI que le permite el anclaje a la membrana plasmática, siendo también más pequeña por la ausencia de péptido señal en el extremo amino terminal y la zona de unión a GPI en el extremo carboxilo terminal. Por ello, se decidió utilizar inóculos recombinantes obtenidos previamente en el laboratorio, utilizando las mismas estrategias a las descritas aquí, para la obtención de priones recombinantes de conejo. A pesar de presentar diferencias aminoacídicas respecto a la secuencia primaria de la PrP recombinante de conejo que podrían manifestarse como barrera de transmisión interespecies, se pretendía al menos reducir la posible barrera de propagación *in vitro* que podría estar regida por las diferencias entre las PrPs recombinante y proveniente de encéfalo. Con este fin, se escogieron dos cepas de priones recombinantes de ratón, ambas obtenidas a partir del prion murino RML mediante rondas seriadas de rec-PMCA pero con un patrón bioquímico distinguible por *Western Blot* que se manifiesta en tamaños ligeramente diferentes de las PrP^{res} (ref. tesis SER). La elección de ambas cepas se hizo basándose en que eran los priones recombinantes infecciosos, testados *in vivo*, de la especie más cercana a conejo disponibles en el laboratorio en el momento en que se planteó el estudio presentado aquí.

De la misma forma que con los dos grupos de inóculos anteriores, las 20 rondas seriadas a dilución 1:10 de rec-PMCA con una dilución inicial de la semilla de 1:10 y con las muestras por sextuplicado junto

con sus respectivos controles sin semilla, no resultaron en malplegamiento a una forma resistente a PK de la PrP recombinante de conejo.

Así pues, a pesar de los esfuerzos realizados y de todas las cepas de priones de diversos orígenes utilizados, no se pudo obtener ninguna PrP^{res} recombinante de conejo de forma directa mediante adición de semilla y pases seriados en rec-PMCA. Ni las cepas provenientes de encéfalos de animales afectados, ni las previamente obtenidas mediante PMCA en homogenizados de encéfalos de conejo, ni las cepas recombinantes murinas pudieron propagar su malplegamiento directamente a la PrP recombinante de conejo complementada con homogenizado de encéfalo de ratón *PRNP*^{r/}.

Tabla 5. Semillas utilizadas y rondas seriadas realizadas en sustrato basado en PrP recombinante de conejo. Listado de los inóculos utilizados clasificados según su procedencia (Encéfalo, proveniente de homogenizados de encéfalo de animales afectados; PMCA, proveniente de PMCA con sustrato basado en homogenizado de encéfalo; y rec-PMCA, proveniente de PMCA con sustrato basado en PrP recombinante y homogenizado de encéfalo de ratón *PRNP*^{r/}). *(Chianini, Fernandez-Borges et al. 2012)

Inóculo	Origen	Repeticiones	Nº rondas PMCA
Sin inocular	-	10	20
RML	Encéfalo	1	20
ME7	Encéfalo	1	20
CWD	Encéfalo	1	20
BSE	Encéfalo	1	20
Sheep BSE	Encéfalo	1	20
De novo RaPrP ^{Sc} *	Encéfalo	1	20
Conejo-RML	PMCA	2	20
Conejo -ME7	PMCA	2	20
Conejo -CWD	PMCA	2	20
Conejo -BSE	PMCA	2	20
Conejo -De novo RaPrP ^{Sc} *	PMCA	2	20
recRatón-RML-SuperHigh	rec-PMCA	2	20
recRatón-RML	rec-PMCA	2	20

2. Generación de PrP recombinantes de conejo con sustituciones específicas de la PrP de ratón

Ante la imposibilidad de malplegar la PrP recombinante de conejo directamente por medio de la adición de semilla y rondas seriadas de rec-PMCA como se hizo previamente para otras especies, se

decidió abandonar dicha estrategia y explorar otras vías tanto para obtener priones recombinantes de conejo como para estudiar la causa de dicha resistencia al malplegamiento *in vitro*.

Podría pensarse que la baja susceptibilidad de los lepóridos a las enfermedades priónicas pudiese determinar la imposibilidad de malplegamiento *in vitro* de la PrP recombinante de conejo. Sin embargo, este hecho no concuerda con la relativa facilidad con la que se obtuvieron priones de conejo mediante PMCA utilizando homogenizado de encéfalo de conejo como sustrato (Chianini, Fernandez-Borges et al. 2012), ni con la consecución de PrP^{res} en PMCA para PrP de otros mamíferos considerados resistentes como cánidos o equinos.

Descartada *a priori* la imposibilidad de malplegar la PrP recombinante de conejo, se planteó la posibilidad de que la barrera de transmisión existente entre los priones provenientes de encéfalo y la PrP recombinante fuese mayor para la proteína de conejo que para otras especies con las que se han obtenido PrP^{res} recombinantes. Así, esta barrera estaría impidiendo la propagación en sustrato recombinante de las semillas provenientes de encéfalos, mientras que la barrera interespecies entre las PrP recombinantes de ratón y conejo impediría la obtención de priones recombinantes de conejo a partir de las cepas recombinantes murinas. Como se detalla en el apartado 2.3.3. de la Introducción, una de las características más peculiares de las distintas cepas de priones es su capacidad de propagarse únicamente sobre determinadas especies o variantes polimórficas. Este fenómeno, conocido como barrera de transmisión está determinada tanto por la secuencia aminoacídica del prion como por la de la PrP de la especie susceptible de ser infectada. Dado que no hubo problemas para obtener, mediante la estrategia de inoculación y pases seriados de rec-PMCA, priones recombinantes de ratón y siendo especies cercanas en términos de secuencia primaria de PrP, se decidió generar una serie de PrP recombinantes de conejo con sustituciones específicas de ratón y posteriormente tratar de malplegar estas *in vitro*.

En la figura 11 se muestra el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las PrP recombinantes de conejo y de ratón con las sustituciones escogidas señaladas.

```

recPrP Conejo      MKKRPKPGGGWNTGGSRYPGQSSSPGGNRYPPQGGGQPHGGGQPHGGGQPHG
recPrP Ratón      .....-.....G.....T.....S.....S.....
                23                                     78

recPrP Conejo      GGWGQPHGGGQGG-THNQWGKPSKPKTSMKHVAGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSAMS
recPrP Ratón      .....G.....N.....NL.....
                79                                     134

recPrP Conejo      RPLIHFNDYEDRYRENMYRYPNQVYYRPVDQYSNQNSFVHDCVNITVKQHTVTTT
recPrP Ratón      ..M.....W.....N.....I.....
                135                                     191

recPrP Conejo      TKGENFTETDIKIMERVVVEQMCITQYQOESQAAYQRAAG-
recPrP Ratón      .....V.M.....V.....K.....Y.DGRRS-
                192                                     230

```

Mutaciones puntuales seleccionadas: G99N, S107N, M108L, L137M, Y144W, S173N, V183I, I202V, I204M, I214V, Q219K

Figura 11. Alineamiento de las secuencias primarias de las PrP recombinantes de conejo y ratón. Mutaciones descartadas señaladas en gris y las seleccionadas en verde y listadas con la numeración de aminoácidos correspondiente a la PrP de ratón, idéntica para el caso de la PrP de conejo.

Aunque inicialmente se pretendía generar una PrP de conejo con cada sustitución que muestra el alineamiento, se decidió descartar algunas de ellas principalmente por su situación en la secuencia. Es el caso de las 4 sustituciones de la región de las octa repeticiones, que aunque implicada de alguna forma en la fisiopatología de las EETs, no es esencial para que un determinado prion cause enfermedad ni para su propagación (Yam, Gao et al. 2010). Este hecho está respaldado por evidencias como la infectividad de la PrP^{res} tras su digestión con PK que digiere todo el extremo amino terminal incluida la región de las octa repeticiones ((Hayashi, Yokoyama et al. 2005), (Howells, Anderson et al. 2008)) o como que la expresión de PrP sin dicha región en ratones *PRNP*^{-/-} restaura la susceptibilidad de los mismos a las infecciones priónicas (Flechsig, Shmerling et al. 2000). A pesar de ello, la existencia de inserciones de octa repeticiones asociadas a diversas formas familiares de ECJ (Hiraga, Kobayashi et al. 2009) y que se han podido reproducir en diversos modelos experimentales ((Hiraga, Kobayashi et al. 2009), (Castilla, Gutierrez-Adan et al. 2004)) demuestran su implicación en el desarrollo de EETs. No obstante, en el caso de las PrPs de conejo y ratón, la ausencia de diferencias en el número de octa repeticiones y su gran similitud con tan solo 4 sustituciones conservadas, llevó a la suposición de que esta región en particular podría ser poco relevante para la barrera de transmisión entre ambas especies. Respecto a las sustituciones en el extremo carboxilo terminal, también se han descartado debido a que es la zona de

unión a GPI *in vivo*, aspecto que no puede modelarse mediante la rec-PMCA al carecer las proteínas recombinantes producidas en *E. coli* de dicha modificación postraducciona. Además, aunque la implicación del GPI en el desarrollo de la patología priónica ya ha sido demostrada principalmente gracias a modelos animales que expresan una PrP sin GPI, los mecanismos moleculares por los que la presencia o ausencia de GPI conducen a un cambio en la patología no están claros. El modelo desarrollado por Chesebro y colaboradores que expresa la PrP murina sin GPI, presenta malplegamiento y grandes placas de PrP^{Sc} al ser infectado por priones de ratón, y aunque presentan la misma infectividad que sus homólogos wt, muestran también un significativo retraso en la aparición de signos clínicos de la enfermedad (Chesebro, Race et al. 2010). La ausencia de la marcada espongiosis que caracteriza la gran mayoría de EETs sugiere además una reducción de neurotoxicidad independiente de la deposición de PrP^{Sc}, lo que concuerda con lo visto en otros modelos que expresan PrP con GPI de otras proteínas no relacionadas (Puig, Altmepfen et al. 2014). También cabe destacar que la eliminación por medios químicos de la GPI en priones preformados no disminuye su infectividad al ser inoculados en animales que expresan PrP anclada por GPI (Lewis, Properzi et al. 2006). De forma que diversas evidencias apuntan a que el efecto del GPI en la patología es independiente de la capacidad de malplegarse e inducir malplegamiento de la PrP. Teniendo esto en cuenta junto con el hecho de que la PMCA sólo replica el evento de malplegamiento de la patología priónica y que además las PrP recombinantes utilizadas para rec-PMCA no presentan anclaje por GPI, se descartó realizar los cambios del extremo carboxilo terminal.

Tras generar las construcciones plasmídicas para cada una de las sustituciones señaladas en la Figura 1, los diferentes mutantes de PrP recombinante de conejo junto con la PrP wt se expresaron en *E. coli* y se purificaron mediante cromatografía de afinidad tal y como se detalla en el apartado 6 de Materiales y Métodos. Tras la elución y la posterior desnaturalización de las PrP recombinantes mediante la adición de hasta 6 M de cloruro de guanidina para su conservación, se determinó su pureza mediante separación por electroforesis en geles SDS-PAGE seguida de tinción por *Coomassie* y se llevaron a la concentración de trabajo de 4-6 mg/ml.

3. Malplegamiento *in vitro* de las PrP mutantes recombinantes de conejo

Una vez generadas todas las PrP recombinantes de conejo con las mutaciones puntuales listadas en la Figura 11, se procedió a la preparación de sustratos para rec-PMCA con cada una de las proteínas

producidas. De la misma forma en que se hizo para el sustrato de PrP recombinante de conejo utilizada para la parte previa, las proteínas recombinantes se dializaron frente a PBS y se complementaron con homogenizados al 10% en PBS (p/v) de encéfalos de ratones *PRNP*^{-/-}. Al querer comparar la capacidad de malplegamiento de los diferentes mutantes entre sí y con respecto a su homólogo wt, se aseguró que todos los sustratos contenían la misma concentración de PrP recombinante (siempre en el rango de 50 a 100 ng/μl) mediante *BCA Protein Assay* y posterior análisis de los sustratos por electroforesis en geles de SDS-PAGE seguido por *Western blot*, tal y como puede observarse en la Figura 12.



Figura 12. Western blot de los sustratos generados con las distintas PrP recombinantes mutadas de conejo. Se incluye también un homogenizado de encéfalo de conejo para ver la diferencia de tamaño respecto a las PrP recombinantes. Las cantidades de PrP recombinante añadidas a cada sustrato fueron igualadas mediante medición por *BCA protein Assay* y dilución en PBS. Revelado con el anticuerpo monoclonal Saf84 (con menor afinidad en el reconocimiento de la PrP recombinante de ratón que en la de conejo, lo que puede explicar la diferente intensidad de señal observada).

3.1. Malplegamiento inducido mediante RML recombinante

Viendo la resistencia que presentó la PrP recombinante de conejo al malplegamiento *in vitro* y dado que las sustituciones realizadas reducen las diferencias entre las secuencias primarias de las PrPs de conejo y ratón, se decidió favorecer el malplegamiento de las PrP mutantes con uno de los priones recombinantes de ratón derivado de la cepa RML (recRML) (ref. tesis SER). De esta forma se pretendía facilitar la propagación del malplegamiento a las PrP recombinantes de conejo mutadas. Eliminando por un lado la barrera de transmisión derivada de las diferencias entre las PrP recombinantes y las

provenientes de encéfalo y esperando por otro lado, que alguna de las mutaciones puntuales realizadas en la PrP de conejo redujese suficientemente la barrera de transmisión interespecies existente.

De forma similar a como se realizó en la primera parte, a cada sustrato que contenía una PrP mutada diferente se añadió inicialmente el prion recRML como semilla a dilución 1:10 y tras cada ronda de 24 horas de PMCA, se añadía también a dilución 1:10 a la siguiente ronda de PMCA parte del producto de la anterior como semilla. En este caso, se utilizaron cuadruplicados de cada mutante con semilla junto con el mismo número de tubos sin semilla inicial, tanto como control de aparición espontánea de PrP recombinante malplegada como de contaminaciones cruzadas.

Los resultados pueden verse esquematizados en la Figura 13, donde se indica el porcentaje de tubos del cuadruplicado que muestran PrP^{res} en cada ronda de rec-PMCA, es decir, el porcentaje de tubos positivos. Como puede apreciarse, no en todos los duplicados apareció PrP^{res} en la misma ronda de PMCA, habiendo diferencias en la aparición en diferentes tubos del mismo sustrato de hasta 6 rondas en algún caso mientras que en otros ni siquiera llegó a obtenerse PrP^{res} en todos los tubos. Precisamente, el uso de cuadruplicados responde a estos fenómenos debidos a la estocasticidad del sistema, que hacen necesario el uso de tantos duplicados como sea posible como control de esta variabilidad intrínseca que presenta la PMCA.

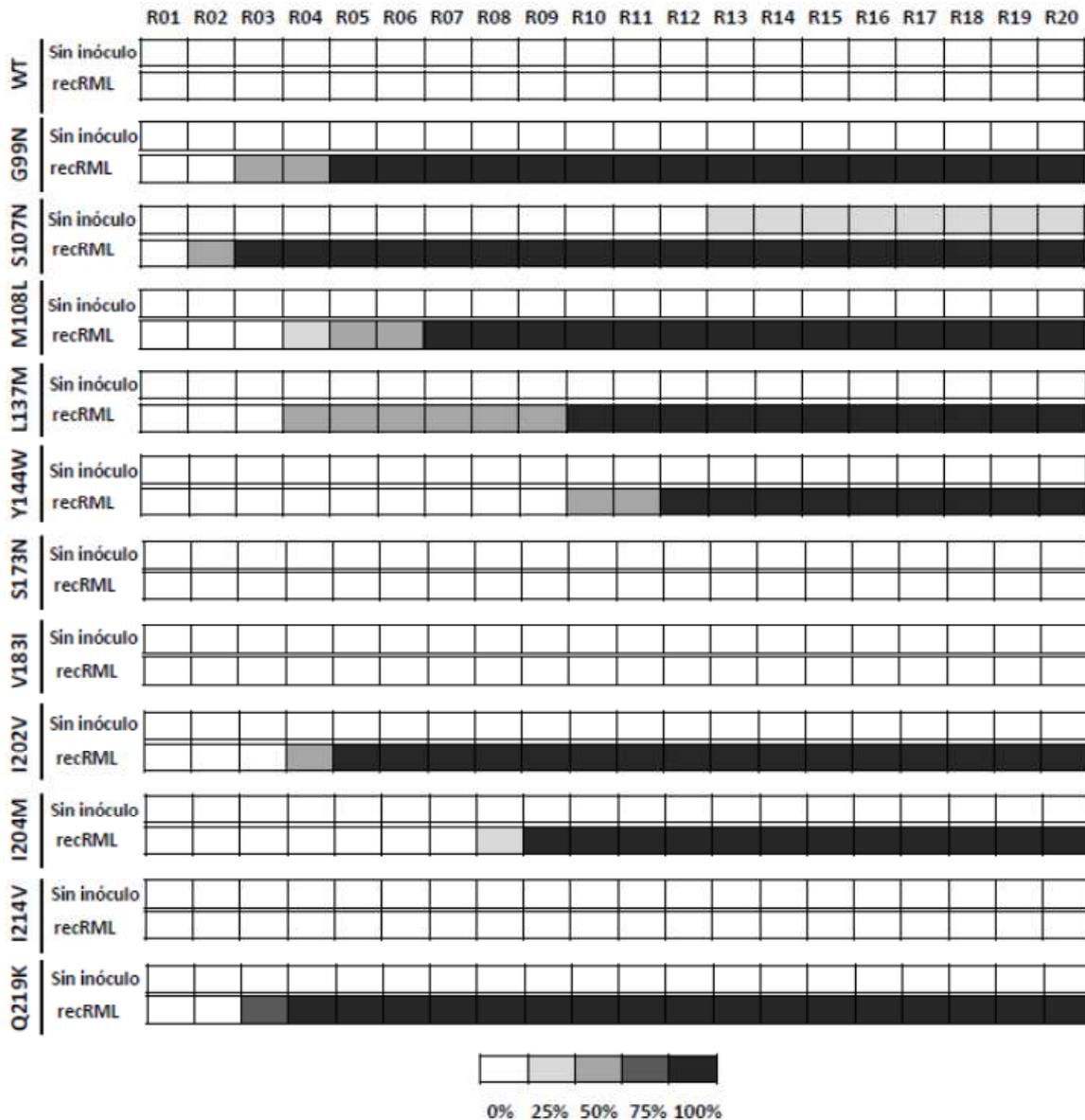


Figura 13. Representación gráfica de la aparición de PrP^{res} durante la propagación *in vitro* de las PrP recombinantes de conejo con sustituciones de ratón con el prion murino recombinante RML como semilla. Evaluado tras análisis mediante *Western blot* de cada una de las rondas de rec-PMCA (señaladas como R01-R20) a las que fueron sometidos los sustratos. El porcentaje de tubos positivos tras cada ronda de rec-PMCA se ha señalado con distintas intensidades de grises, tal y como se indica en la leyenda inferior de la figura.

De las 11 PrP recombinantes de conejo mutadas, 8 pudieron ser malplegadas por el inóculo recRML murino a PrP^{res} y uno de ellos, la PrP de conejo con la sustitución S107N, se malplegó incluso espontáneamente aunque sólo en el 25% de los tubos. En todos los casos se observó mediante *Western blot* la aparición de una banda resistente a PK de 16-17 KDa, sin diferencias apreciables de patrón entre

ellas tal como puede verse en las Figuras 15 y 18. A pesar de que se ha visto que la aparición más temprana de PrP^{res} podría correlacionarse con una mayor susceptibilidad a las enfermedades priónicas *in vivo* (ref. tesis Chas), la diferencia en el número de rondas necesarias para la primera aparición de PrP^{res} carece de relevancia en este caso. Principalmente porque el objetivo del experimento consistía en discernir qué sustituciones favorecen la capacidad de malplegamiento de la PrP recombinante de conejo, sin tratar de evaluar cuál de ellas podría ser más relevante o tener un mayor efecto. Es por ello también, por lo que no se realizaron duplicados interexperimentales para reducir el efecto de la estocasticidad en los resultados y establecer una jerarquía entre las sustituciones. Además, la estocasticidad interexperimental también limita la utilidad de las repeticiones a la hora de evaluar las posiciones más o menos críticas en la susceptibilización al malplegamiento de las PrP recombinantes de conejo mutadas.

3.2. Malplegamiento inducido mediante RML procedente de encéfalo de ratón afectado

Con la intención de seleccionar aquellas mutaciones que tienen un mayor efecto en la reducción de la barrera de transmisión entre las PrPs de ratón y conejo, optamos finalmente por realizar el mismo experimento que el previo pero utilizando directamente la cepa priónica RML derivada de encéfalo de ratones afectados (BrainRML). Así, añadiendo la dificultad que presenta la barrera existente entre las PrP recombinantes y provenientes de encéfalo para el malplegamiento de las PrP recombinantes, se pretendían seleccionar aquellas PrP recombinantes de conejo mutadas capaces de ser malplegadas, siendo las que presentarían una mayor reducción de la barrera interespecies. Para ello, con las PrP recombinantes de conejo capaces de ser malplegadas por recRML, se realizó el mismo experimento de rondas seriadas en rec-PMCA con cada muestra por cuadruplicado añadiendo BrainRML de ratón como semilla a dilución inicial de 1:10. Igualmente, se realizaron 20 rondas seriadas de PMCA utilizando el mismo factor de dilución entre cada ronda e incluyendo también el mismo número de tubos sin semilla inicial como control. De esta forma, los controles sin semilla se han repetido 2 veces para cada uno de los mutantes positivos para PrP^{res} en el experimento anterior, descartando las contaminaciones cruzadas o la aparición de malplegados espontáneamente salvo en el caso de la sustitución S107N cuya conversión espontánea a PrP^{res} fue confirmada. Los resultados del experimento se muestran en la Figura 4 en el mismo formato que para el experimento anterior.

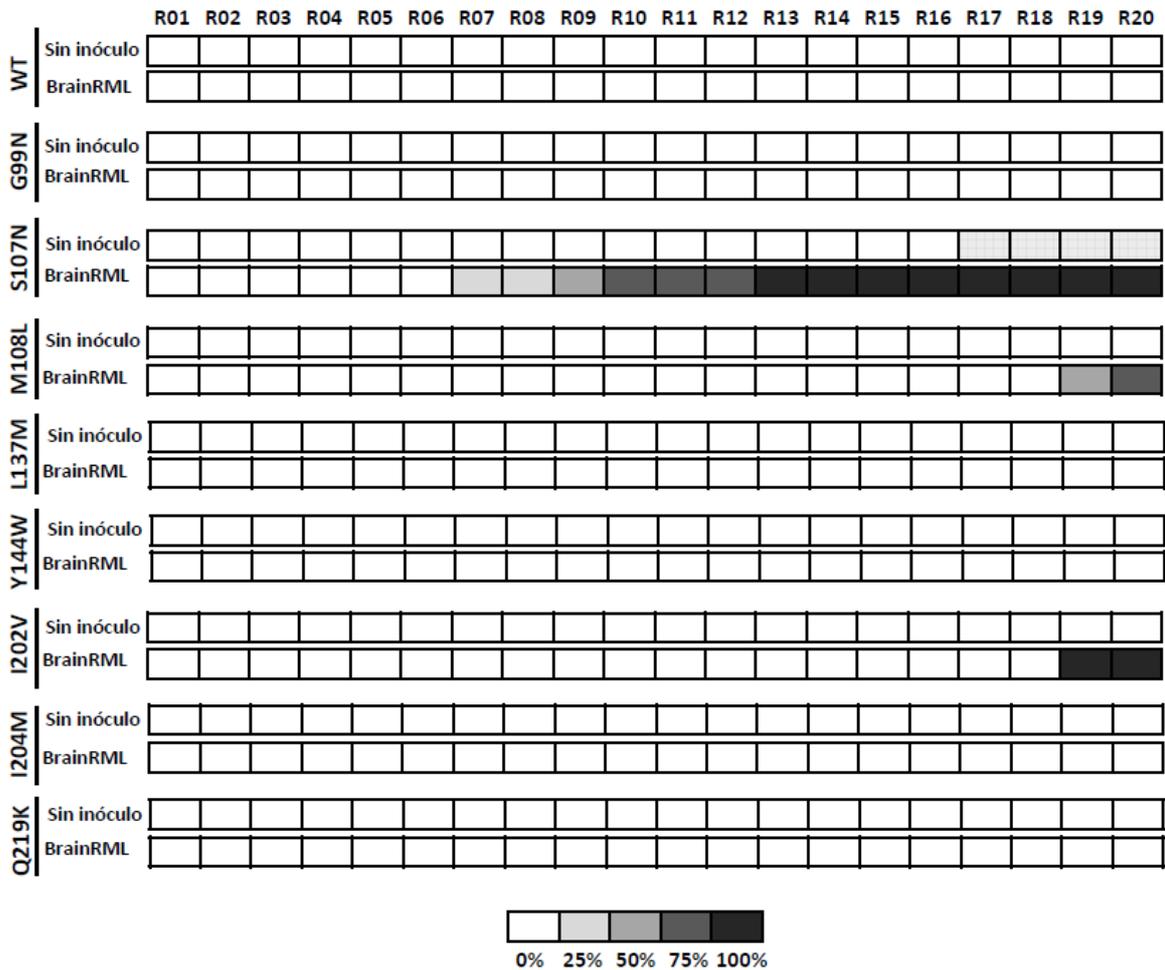


Figura 14. Representación gráfica de la aparición de PrP^{res} durante la propagación *in vitro* de las PrP recombinantes de conejo con sustituciones de ratón con el prion murino RML proveniente de encéfalo de animales afectados como semilla. Evaluado tras análisis mediante *Western blot* de cada una de las rondas de rec-PMCA (señaladas como R01-R20) a las que fueron sometidos los sustratos. El porcentaje de tubos positivos tras cada ronda de rec-PMCA se ha señalado con distintas intensidades de grises, tal y como se indica en la leyenda inferior de la figura.

Como puede apreciarse en la Figura 14, únicamente 3 de las PrP recombinantes de conejo mutadas fueron malplegadas por el BrainRML de las 8 que habían sido malplegadas por la semilla recombinante. Así pues, las sustituciones S107N, M108L y I202V parecen ser las que más reducen la barrera de transmisión interespecies entre ratones y conejos, ya que independientemente del número de ronda de PMCA en que aparece la PrP^{res} por primera vez, son las 3 únicas PrPs que han podido ser malplegadas por el prion murino proveniente de encéfalo. Al comparar los resultados de la aparición de PrP^{res} en los sustratos que contienen PrP recombinante de conejo con sustituciones específicas de ratón con las

rondas seriadas de rec-PMCA necesarias para la generación de priones recombinantes murinos, queda patente una vez más que el número de rondas requerido para el malplegamiento no es el mejor indicador del grado de barrera de transmisión. Pues a pesar de no existir barrera interespecies, el malplegamiento de la PrP recombinante de ratón inducida por BrainRML requirió en su día 13 rondas, más que la PrP de conejo S107N.

Si se presta atención al número de ronda de PMCA en que aparece PrP^{res} en cada mutante comparando la aparición en los que se añadió recRML y en los con que se añadió BrainRML tal y como se muestran en la figura 15, puede apreciarse que el número de rondas necesario para la aparición de PrP^{res} inducida por recRML no muestra una correlación directa con la aparición de PrP^{res} inducida por BrainRML. Tal y como apuntan los mutantes G99N, L137M y Q219K, que a pesar de ser malplegados por recRML en rondas igual de tempranas que el S107N, el M108L o el I202V, no pudieron ser malplegadas mediante adición de BrainRML. Sin embargo, puede observarse cierta correlación entre la aparición más temprana de malplegamiento inducida por recRML y la aparición de malplegamiento inducida por BrainRML, puesto que a más temprana aparición de PrP^{res} derivada de recRML, antes aparece PrP^{res} derivada de BrainRML en el caso de las 3 PrP mutadas de conejo que fueron malplegadas por ambas semillas.

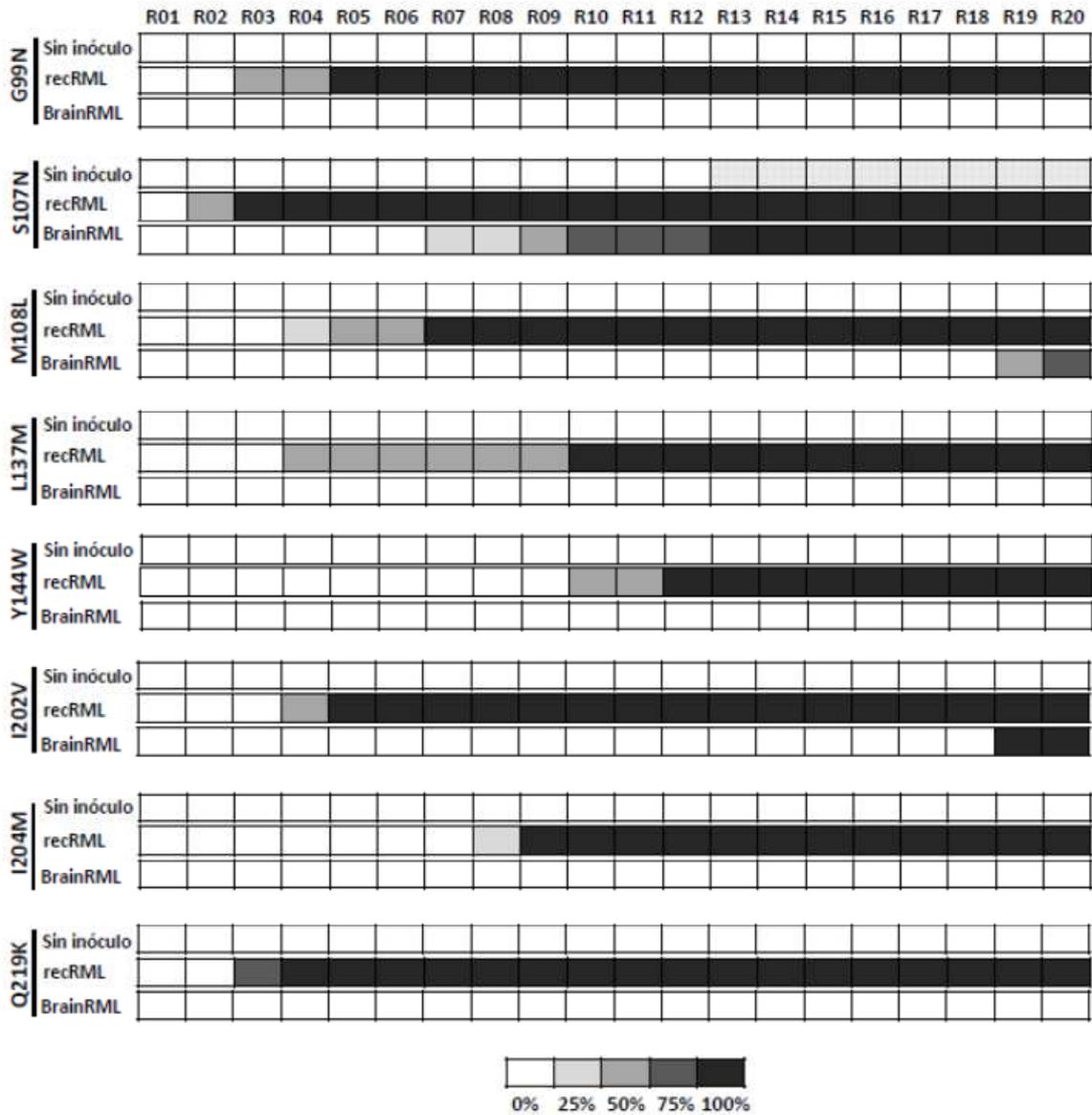


Figura 15. Representación gráfica de la aparición de PrP^{res} durante la propagación *in vitro* de las PrP recombinantes de conejo con sustituciones de ratón con el prion murino RML recombinante y proveniente de encéfalo de animales afectados como semillas. Resumen de los resultados de aquellas PrPs de conejo mutadas que pudieron ser malplegadas por recRML y/o BrainRML. Evaluado tras análisis mediante *Western blot* de cada una de las rondas de rec-PMCA (señaladas como R01-R20) a las que fueron sometidos los sustratos. El porcentaje de tubos positivos tras cada ronda de rec-PMCA se ha señalado con distintas intensidades de grises, tal y como se indica en la leyenda inferior de la figura.

3.3. Evaluación de la capacidad de propagación en sus propios sustratos

Con intención de verificar que las PrP^{res} recombinantes obtenidas en las rondas seriadas de rec-PMCA son realmente capaces de transmitir el malplegamiento y descartar que sean artefactos o agregados sin las características esperadas para los priones además de la resistencia a PK, realizamos diluciones con cada una de las PrP^{res} obtenidas como semilla en sus propios sustratos. Tal y como se detalla en el apartado 9 de Materiales y Métodos, la semilla inicial fue eliminada por medio de un mínimo de 15 rondas seriadas de rec-PMCA, de forma que la PrP^{res} obtenida tras la última ronda de rec-PMCA correspondía a una dilución 1:10¹⁵ de la semilla inicial, que basándose en el número de Avogadro asegura la dilución completa de todas las moléculas de PrP^{res} de la semilla inicial (Saa, Castilla et al. 2006). Además de eliminar la PrP^{Sc} inicial, se igualaron en la medida de lo posible las cantidades de PrP^{res} en cada producto de rec-PMCA por dilución en encéfalo de ratón *PRNP*^{-/-} comprobado por electroforesis seguido de *Western blot*. Las diluciones seleccionadas para igualar cantidades de PrP^{res} se muestran en la Figura 16 junto con los sustratos, con lo que se pretendía eliminar la variabilidad en la máxima dilución de semilla con la que puede detectarse el malplegamiento, que depende tanto de la cantidad de semilla como de la concentración de PrP en el sustrato.

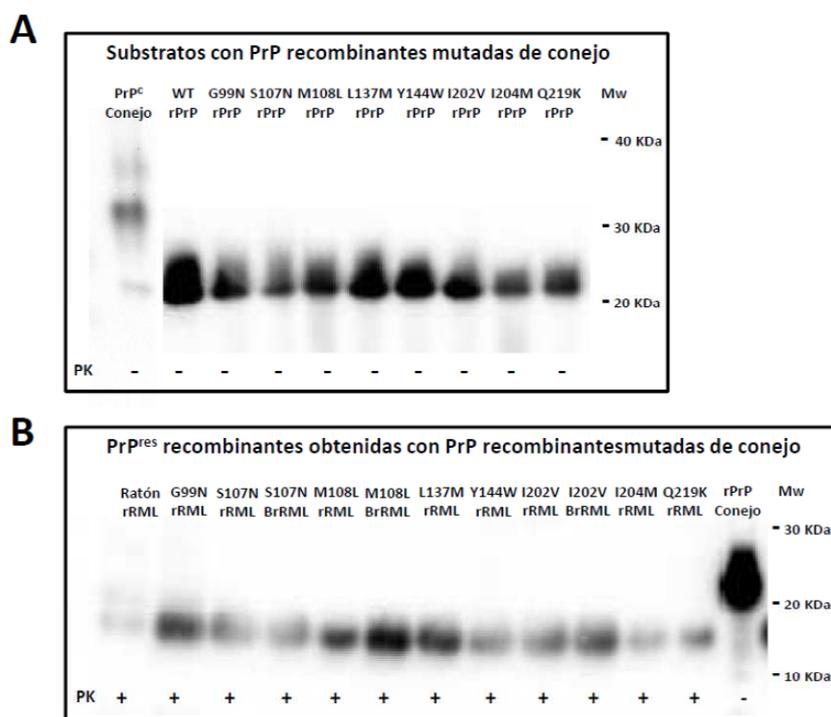
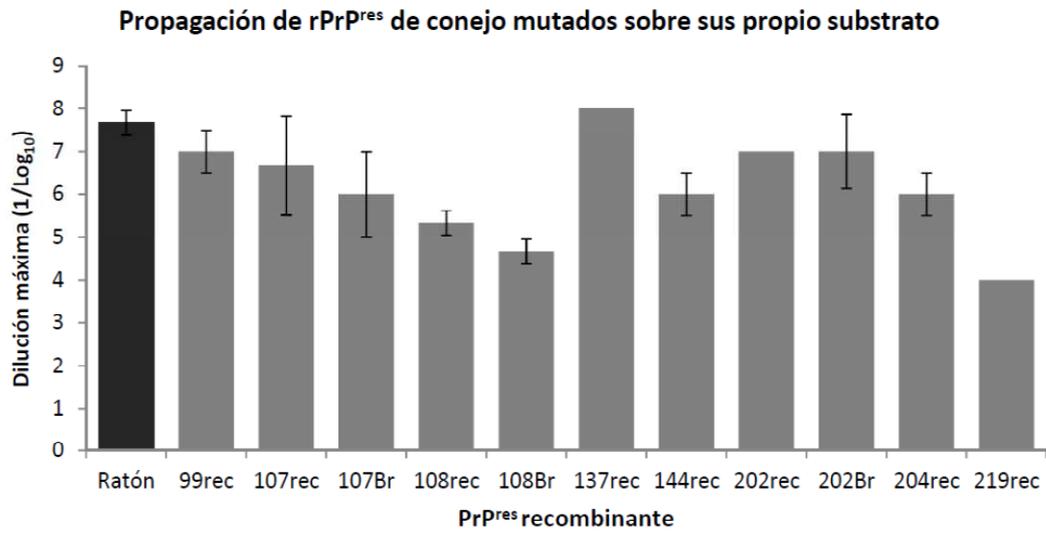


Figura 16. *Western blot* de sustratos con PrP recombinantes de conejo mutadas y de las PrP^{res} recombinantes obtenidas mediante adición de semilla y pases seriados de rec-PMCA con RML recombinante y proveniente de

encéfalo. A) La cantidad de PrP recombinante en cada sustrato se igualó mediante *BCA protein Assay* y **B)** las cantidades de PrP^{res} se ajustaron mediante dilución con homogenizado de encéfalo de ratón *PRNP*^{0/0} y visualización mediante Western blot. Revelado con el anticuerpo monoclonal Saf84 (con menor afinidad en el reconocimiento de la PrP recombinante de ratón que en la de conejo, lo que puede explicar la diferente intensidad de señal observada).

Se añadió semilla en 8 tubos de cada sustrato que contenían PrP recombinantes de conejo con sustituciones de ratón, la semilla generada en ese mismo sustrato se añadió a diluciones 1:10, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵, 1:10⁶, 1:10⁷ y 1:10⁸. Así, en una sola ronda de 48 horas de rec-PMCA se verificó que las nuevas semillas generadas tenían capacidad para propagar su malplegamiento, al menos a la misma PrP recombinante. Se realizó el experimento por triplicado para reducir la variabilidad que podría derivar de la rec-PMCA. Los resultados de estas rondas de rec-PMCA con diluciones de las semillas generadas en los experimentos previos se muestran en la Figura 17 junto con los *Western blot* de un experimento representativo.

A



B

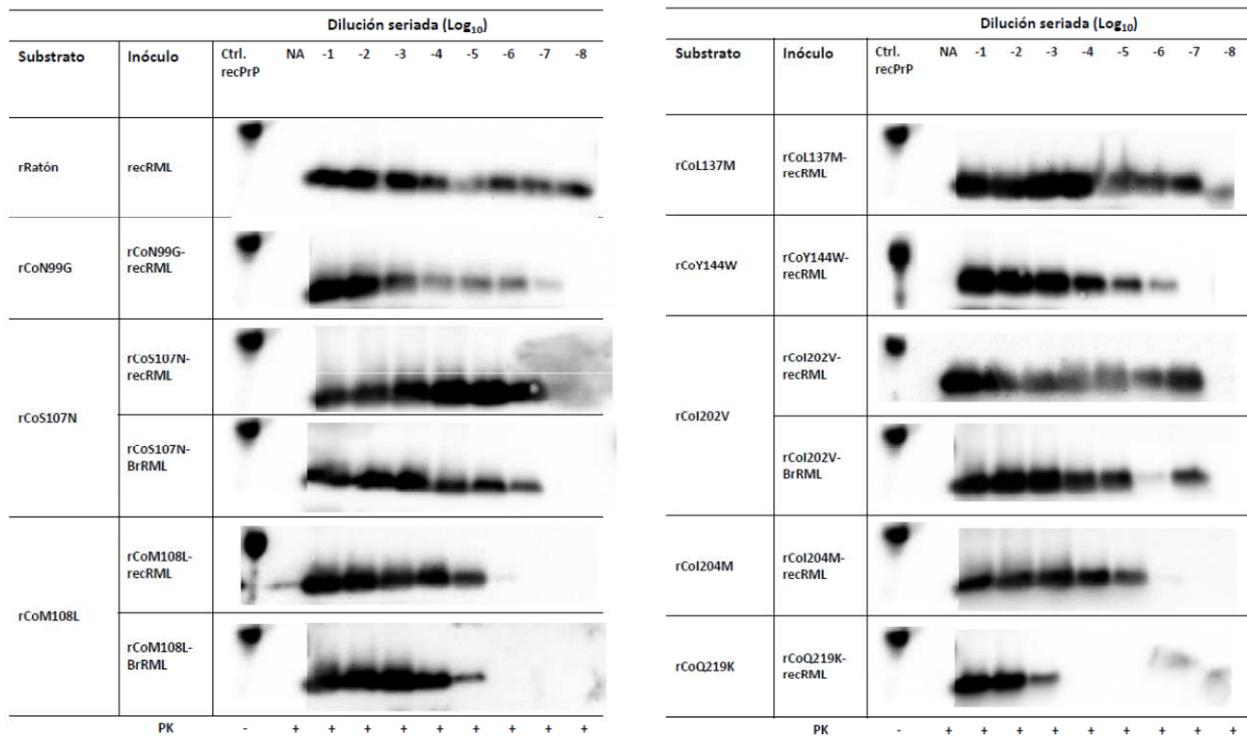


Figura 17. Estudio de la capacidad de propagación de las PrP^{res} de conejo mutadas sobre sus propios sustratos.
A) Representación gráfica de la media (incluyendo la desviación estándar de la media) de las diluciones máximas a la que pudo propagar cada PrP^{res} en un sustrato que contenía la PrP recombinante con la misma mutación. En el eje horizontal se identifican la PrP^{res} utilizadas por la posición de su mutación y por la semilla de origen, rec para las malplegadas por RML recombinante y Br para las malplegadas por RML proveniente de encéfalo. La PrP

recombinante de ratón y el RML recombinante original se utilizaron como controles positivos. **B)** *Western blot* de uno de los experimentos representativo de las 3 réplicas realizadas. Las PrP^{res} fueron diluidas 1:10, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵, 1:10⁶, 1:10⁷ y 1:10⁸ y sometidas a una ronda de 48 horas de rec-PMCA en sustratos que contienen la PrP recombinante con la misma mutación. La primera columna indica la PrP recombinante en el sustrato y la segunda describe la PrP^{res} utilizada, por la posición de su mutación y por la semilla de origen, rec para las malplegadas por RML recombinante y Brain para las malplegadas por RML proveniente de encéfalo. En todos los casos se incluye un control del sustrato sin digerir y un control de la dilución 1:10 de PrP^{res} sin someter a rec-PMCA que se denomina no amplificado (NA) para distinguir la señal de la semilla original de las que realmente fueron propagadas. Revelados con el anticuerpo monoclonal 12B2.

Como puede verse, todas las PrP^{res} generadas en las distintas PrP recombinantes de conejo mutadas son capaces de propagar el malplegamiento en su propio sustrato con ligeras diferencias en su capacidad de propagación. A pesar de haber sido generados a partir de una misma semilla, la dilución máxima que alcanzan en ausencia de barreras de transmisión varía desde 10⁻⁴ a 10⁻⁸ poniendo de manifiesto las diferencias debidas a las mutaciones puntuales, que como en el caso de otras especies tendrían un efecto sobre la susceptibilidad de la PrP del sustrato, así como de la capacidad propagativa de cada inóculo generado. Sin embargo, al tratar de correlacionar la eficiencia de propagación con los anteriores estudios de malplegamiento, no se observa ninguna relación entre la aparición temprana de PrP^{res} con una mayor o menor capacidad de autopropagación como demuestran por ejemplo los mutantes L137M y Q219K que dan lugar a PrP^{res} en rondas similares de rec-PMCA pero muestran capacidades de propagación opuestas.

Cabe prestar especial atención a las 3 PrP recombinantes que pudieron ser malplegadas tanto con recRML como con el BrainRML como semilla, puesto que se ha considerado por ello que estas mutaciones son las que más reducen la barrera de transmisión o las que hacen a la PrP de conejo más susceptible al malplegamiento. En lo que respecta a su capacidad de propagación, puede verse que no son las más eficientes, quedando siempre a diluciones menores que el recRML en su propio sustrato con PrP recombinante de ratón. De hecho, la PrP^{res} obtenida con la PrP M108L con BrainRML como semilla es una de las que muestra peor capacidad de propagación mientras que las obtenidas en PrP S107N o I202V se acercan a los niveles de propagación vistos en el control de ratón, evidenciando otra vez la escasa relación entre aparición de PrP^{res} y la capacidad propagativa. Resulta también destacable, la gran similitud que muestran en su capacidad de propagación las PrP^{res} obtenidas tanto con recRML como con BrainRML entre sí, indicando que o bien la mutación en la PrP recombinante es la que rige la capacidad de propagación o que posiblemente no hay diferencias de cepa debidas al inóculo original.

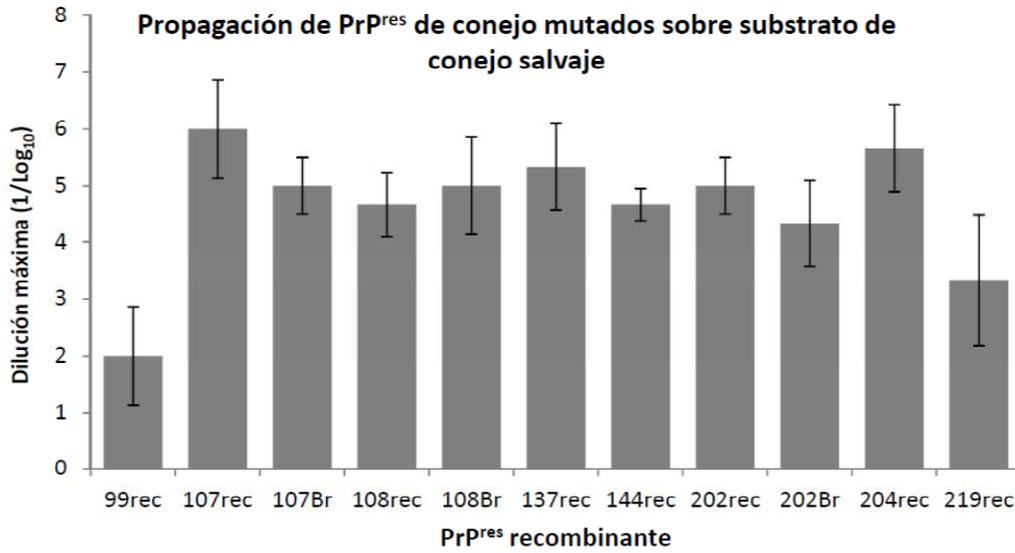
4. Superación de la barrera de transmisión entre conejo y ratón mediante las PrP^{res} recombinantes de conejo con sustituciones de ratón

Una vez verificado que las PrP^{res} obtenidas que difieren del conejo wt en una única sustitución podían ser propagadas *in vitro* en su propio sustrato, se trató de superar la barrera de transmisión que impide la conversión directa de la PrP recombinante de conejo wt a través de las PrP^{res} mutadas. Se esperaba que las PrP^{res} obtenidas, al ser tan similares en su secuencia aminoacídica a la PrP recombinante de conejo wt, pudieran favorecer su malplegamiento *in vitro*, superando la barrera de transmisión mediante adaptación de los priones murinos en los mutantes de PrP recombinantes de conejo.

Para obtener una PrP recombinante de conejo wt malplegada, se añadieron cada una de las PrP^{res} obtenidas en los experimentos previos como semillas a 8 tubos de sustrato que contenía PrP recombinante de conejo complementado con homogenizado de encéfalo de pollo en lugar de encéfalo de ratón *PRNP*^{-/-}. Dado que se ha visto que la PrP de pollo no interfiere con el malplegamiento de otras PrPs y confiere una mayor eficiencia en la propagación de diluciones seriadas de inóculo (ref. tesis Chas). Cada semilla se diluyó de forma seriada en los 8 tubos de sustrato con PrP recombinante de conejo a diluciones 1:10, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵, 1:10⁶, 1:10⁷ y 1:10⁸ y tras una sola ronda de 48 horas de rec-PMCA se evaluó por *Western blot* si la PrP recombinante de conejo wt pudo ser malplegada por alguno de las PrP^{res} generadas previamente. Cabe destacar, que igual que en el experimento previo de dilución seriada, se realizaron 3 repeticiones y que la cantidad de todas las PrP^{res} se igualó en la medida de lo posible por dilución en encéfalo de ratón *PRNP*^{-/-} tal y como se muestra en la figura 6B.

Los resultados de la propagación de las diferentes PrP^{res} recombinantes sobre la PrP recombinante de conejo wt se muestran en la figura 18, donde puede apreciarse que todas las PrP recombinantes de conejo con mutaciones de ratón malplegadas por RML son capaces de inducir el cambio conformacional en la PrP recombinante de conejo wt en una sola ronda de rec-PMCA, cosa que no pudo conseguirse utilizando directamente priones murinos o priones provenientes de encéfalos de conejos wt infectados ni tras 20 rondas seriadas de rec-PMCA.

A



B

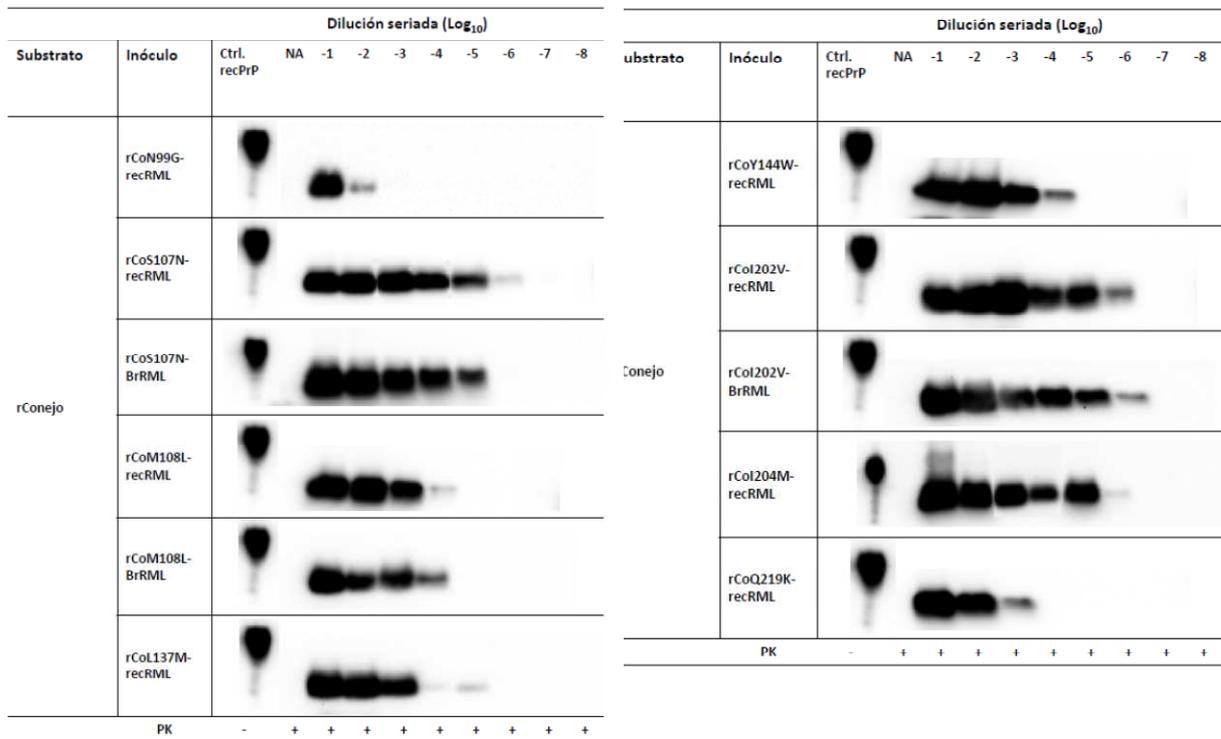


Figura 18. Estudio de la capacidad de propagación de las PrP^{res} de conejo mutadas sobre sustrato con PrP recombinante de conejo wt. A) Representación gráfica de la media (incluyendo la desviación estándar de la media) de las diluciones máximas a las que pudo propagar cada PrP^{res} en el sustrato que contenía la PrP recombinante de

conejo wt. En el eje horizontal se identifican las PrP^{res} utilizadas por la posición de su mutación y por la semilla de origen, rec para las malplegadas por RML recombinante y Br para las malplegadas por RML proveniente de encéfalo. **B)** *Western blot* representativo de uno de los experimentos de las 3 réplicas. Las PrP^{res} fueron diluidas desde 1:10 hasta 1:10⁸ y sometidas a una ronda de 48 horas de rec-PMCA en sustratos que contienen la PrP recombinante de conejo wt. La primera columna indica la PrP recombinante del sustrato y la segunda describe la PrP^{res} utilizada, por la posición de su mutación y por la semilla de origen, rec para las malplegadas por RML recombinante y Br para las malplegadas por RML proveniente de encéfalo. En todos los casos se incluye un control del sustrato sin digerir y un control de la dilución 1:10 de PrP^{res} sin someter a rec-PMCA que se denomina no amplificado (NA) para distinguir la señal de la semilla original de las realmente propagadas. Revelados con el anticuerpo monoclonal 12B2.

Llama la atención el hecho de que a pesar de tener el mismo origen, las PrP^{res} que se distinguen entre sí en dos posiciones y una sola respecto al genotipo wt, propagan con diferentes capacidades en un mismo sustrato. En las diluciones previas de cada PrP^{res} en su propio sustrato, las diferencias en la capacidad de propagación podían achacarse a las diferencias tanto de los sustratos como de los inóculos. Sin embargo, en este caso en que el sustrato es el mismo para todas las PrP^{res}, puede apreciarse más claramente la barrera que supone la mutación en la PrP^{res} respecto a la PrP de conejo wt. Así, algunas PrP^{res} muestran una mayor eficiencia de propagación en PrP de conejo wt. Entre ellas, las que contienen las mutaciones S107N e I202V, que a pesar de ser las que más reducen la barrera entre el prion RML de ratón y la PrP de conejo, no parecen suponer una barrera importante para la propagación de malplegamiento a la PrP de conejo wt. Mientras tanto, otros muestran una capacidad reducida de propagación como el G99N y el Q219K, apuntando hacia una mayor barrera interespecies debida a estos cambios aminoacídicos. Tampoco podemos descartar que a pesar de compartir el inóculo de origen, las diferencias en las capacidades de propagación observadas para los distintos mutantes puedan deberse a la generación de distintas cepas, ya sea a consecuencia de las diferentes mutaciones o por el propio proceso de la rec-PMCA (Noble, Wang et al. 2015).

Una vez visto que las PrP^{res} generadas en las PrP recombinantes de conejo con mutaciones de ratón pueden inducir en una sola ronda de rec-PMCA el malplegamiento de la PrP recombinante de conejo wt y dada la posibilidad de que se hubieran generado distintas cepas, se decidió adaptar todos los inóculos generados a PrP recombinante de conejo wt diluyendo el inóculo original mediante pases seriados hasta su eliminación.

Como se ha descrito previamente, la semilla inicial fue eliminada por medio de un mínimo de 15 rondas seriadas de rec-PMCA, de forma que la PrP^{res} obtenida tras la última ronda de rec-PMCA correspondía a una dilución 1:10¹⁵ de la semilla inicial, que basándose en el número de Avogadro

asegura la dilución completa de todas las moléculas de PrP^{res} de la semilla inicial (Saa, Castilla et al. 2006). Así, se pretendía estudiar en mayor detalle si las diferencias de propagación observadas en experimentos previos son debidas a las diferencias aminoacídicas o realmente se han generado distintas cepas, que una vez adaptadas a PrP recombinante de conejo wt deberían mostrar características que las distinguan.

Con este objetivo, se realizó un primer estudio de propagación mediante diluciones seriadas de cada PrP^{res} en sustrato con PrP recombinante de conejo wt complementado con homogenizado de encéfalo de pollo. Igual que para los anteriores estudios de dilución seriada, se realizaron 3 réplicas y se trató de igualar en la medida de lo posible la cantidad de PrP^{res} presente en cada semilla mediante dilución con encéfalo de ratón *PRNP*^{-/-}, como puede verse en la figura 19.

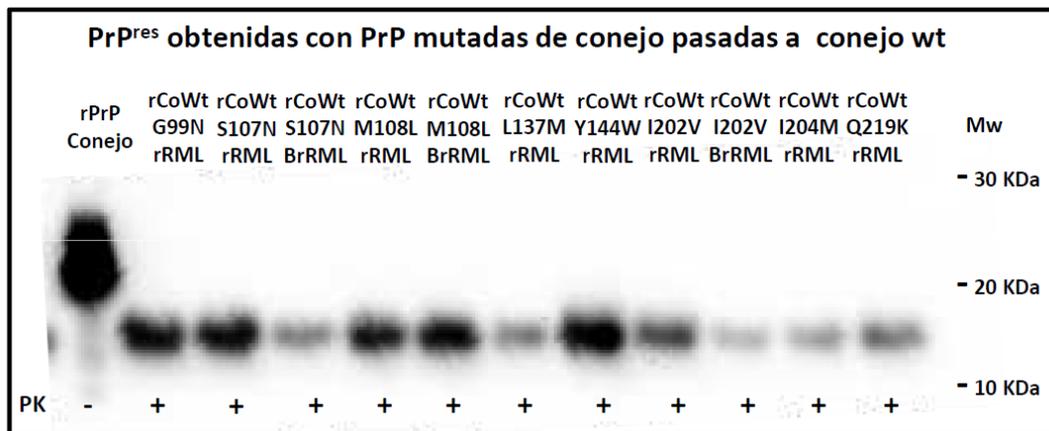
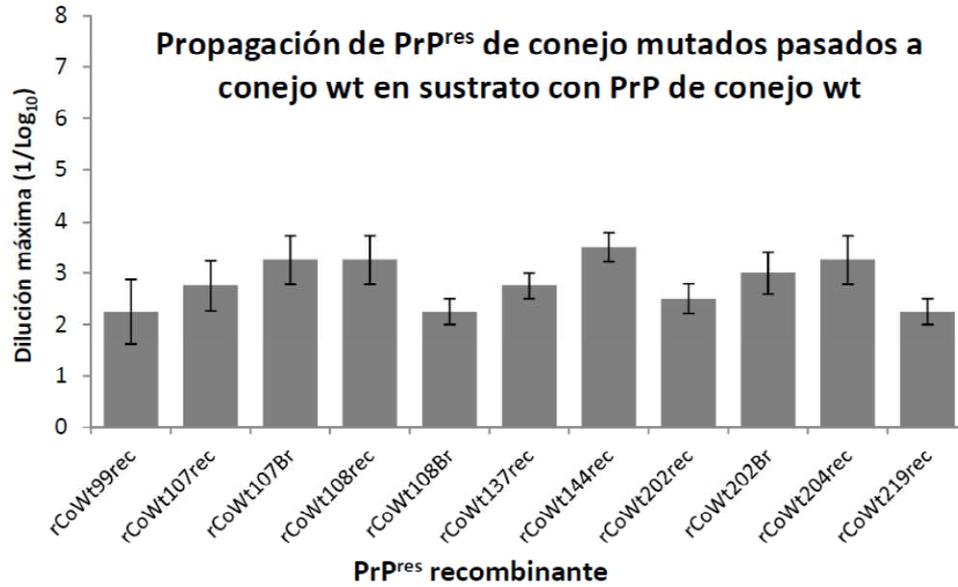


Figura 19. Western blot de las PrP^{res} recombinantes obtenidas mediante adición de semilla y pases seriados de rec-PMCA con las PrP^{res} de conejo mutadas como semilla en sustrato con PrP recombinante de conejo wt. Las cantidades de PrP^{res} se ajustaron mediante dilución con homogenizado de encéfalo de ratón *PRNP*^{-/-} y visualización mediante Western blot. Reveladas con el anticuerpo monoclonal Saf84.

Finalmente, se añadió cada PrP^{res} como semilla en 8 tubos del sustrato a diluciones seriadas de 1:10, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵, 1:10⁶, 1:10⁷ y 1:10⁸ que se sometieron a una sola ronda de 48 horas de rec-PMCA y cuyos resultados se muestran en la figura 20.

A



B

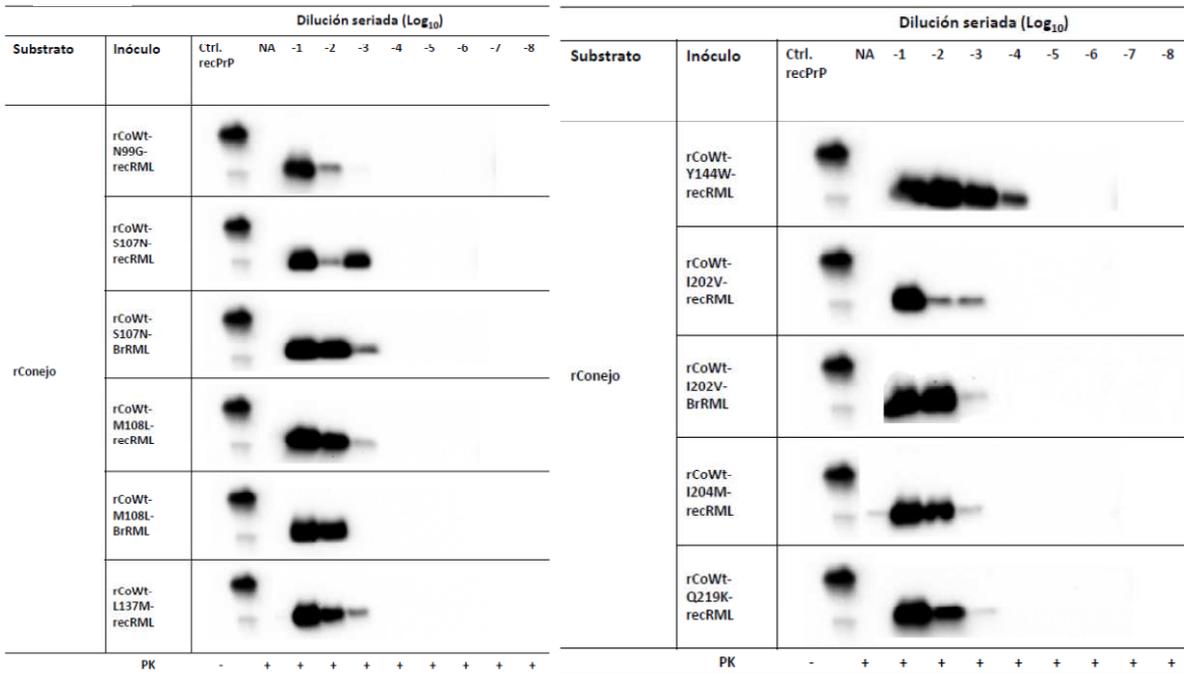


Figura 20. Estudio de la capacidad de propagación de las PrP^{res} de conejo mutadas adaptadas a PrP de conejo wt sobre sustrato con PrP recombinante de conejo wt. A) Representación gráfica de la media (incluyendo la desviación estándar de la media) de las diluciones máximas a las que pudo propagar cada PrP^{res} adaptada a PrP de conejo wt en el sustrato que contenía la PrP recombinante de conejo wt. En el eje horizontal se identifican la PrP^{res}

utilizada por la posición de la mutación de la PrP^{res} de la que derivan y por la semilla de origen, rec para las malplegadas por RML recombinante y Br para las malplegadas por RML proveniente de encéfalo. El prefijo rCoWt indica que están adaptadas a la PrP recombinante de conejo wt. **B) Western blot** de un experimento representativo de una de las 3 réplicas llevadas a cabo. Las PrP^{res} fueron diluidas a 1:10, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵, 1:10⁶, 1:10⁷ y 1:10⁸ y sometidas a una ronda de 48 horas de rec-PMCA en sustrato que contiene la PrP recombinante de conejo wt. La primera columna indica la PrP recombinante del sustrato y la segunda describe la PrP^{res} utilizada, por la posición de la mutación de la PrP^{res} de la que derivan y por la semilla de origen, rec para las malplegadas por RML recombinante y Br para las malplegadas por RML proveniente de encéfalo. En todos los casos se incluye un control del sustrato sin digerir y un control de la dilución 1:10 de PrP^{res} sin someter a rec-PMCA que se denomina no amplificado (NA) para distinguir la señal de la semilla original de las realmente propagadas. Revelados con el anticuerpo monoclonal 12B2.

Sorprendentemente, puede apreciarse una reducción significativa en la capacidad de propagación de prácticamente todas las PrP^{res} adaptadas a conejo wt respecto a los inóculos originales con las mutaciones de ratón, a pesar de la eliminación de cualquier tipo de barrera debida a las diferencias aminoacídicas entre las PrPs del inóculo y del sustrato. Además, se reducen también las diferencias de propagación observadas con las PrP^{res} con mutaciones sobre sustrato con PrP de conejo wt, apuntando hacia la existencia de una sola cepa. Puesto que las diferencias vistas entre las distintas semillas en la prueba anterior no se mantienen, a pesar de la conocida capacidad de la PMCA para mantener las características de cepa (Castilla, Morales et al. 2008), y puesto que todas las PrP^{res} adaptadas a PrP recombinante de conejo wt muestran capacidades de propagación muy similares, podría pensarse que o bien las diferencias vistas en el experimento previo se deben exclusivamente a las diferencias aminoacídicas y no a características de cepa o por el contrario, que a pesar de haberse generado distintas cepas debidas a las mutaciones, las rondas seriadas de rec-PMCA en el sustrato con PrP de conejo wt hace que converjan a una sola cepa de PrP^{res}.

5. Análisis de las características bioquímicas de los inóculos generados mediante ensayo de resistencia a Proteinasa K

Con la intención de estudiar en más detalle la posible existencia de cepas diferentes de PrP^{res} de conejo wt derivadas de las PrP^{res} de conejo con diversas mutaciones, se realizó un ensayo de resistencia a PK, puesto que se sabe que es una de las propiedades que define a los priones y se utiliza como marcador patognomónico de la enfermedad (McKinley, Bolton et al. 1983) y que es además una característica distintiva de diferentes cepas priónicas.

El grado de resistencia a PK de todas las PrP^{res} obtenidas en PrP de conejo wt junto con el del recRML original en PrP de ratón, se evaluó tratando éstas con cantidades crecientes de PK a lo largo de 3

experimentos independientes. Concretamente, las muestras fueron tratadas durante 1 hora a 42°C con 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 y 3200 µg/ml de PK y su grado de resistencia fue evaluado mediante *Western blot* y análisis densitométrico como puede observarse en la figura 21.

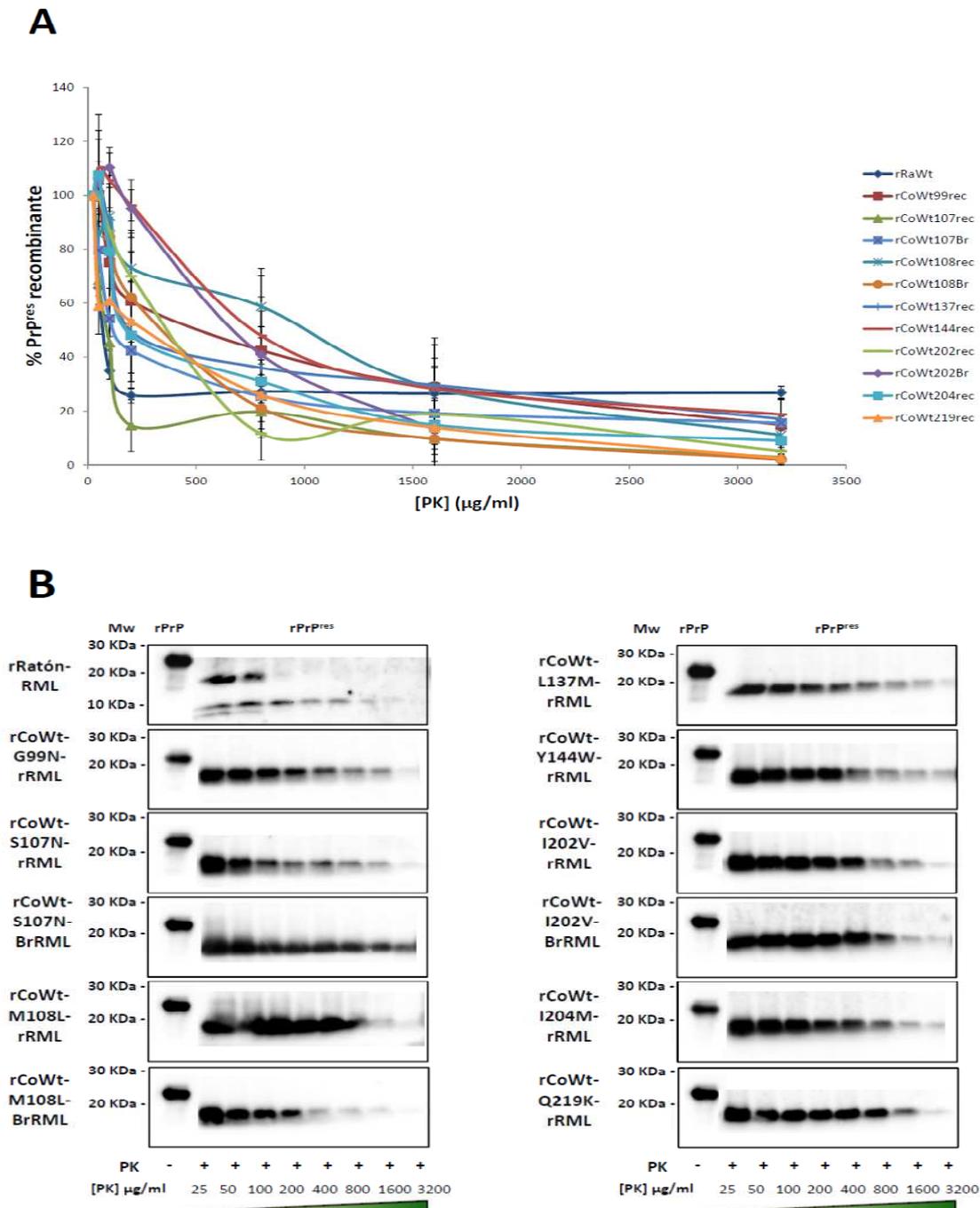


Figura 21. Estudio de la resistencia a PK de las distintas PrP^{res} obtenidas en sustrato con PrP de conejo wt A) Representación gráfica del análisis densitométrico de las bandas inmunoreactivas obtenidas por *Western blot* tras

la digestión de las muestras con concentraciones crecientes de PK en 3 experimentos independientes. La densidad de la señal obtenida tras digerir con 25 µg/ml se consideró como 100% y los cálculos posteriores se hicieron en relación a ésta. **B)** *Western blot* representativo de la resistencia a concentraciones crecientes de PK de las muestras PrP^{res} obtenidas en sustrato con PrP recombinante de conejo wt *in vitro*. Se ha incluido PrP recombinante de conejo wt sin digerir como control. Revelado con el anticuerpo monoclonal 12B2.

Si se observan únicamente los *Western blot* que muestran un experimento representativo de las tres repeticiones realizadas, pueden apreciarse a simple vista diferencias entre los patrones de resistencia a PK. No obstante, tras el análisis densitométrico realizado sobre los *Western blot* de las 3 réplicas y su representación gráfica, las diferencias en los perfiles de resistencia a PK ya no resultan tan claras. Sobre todo, teniendo en cuenta la gran desviación estándar respecto a la media que muestran la mayoría de PrP^{res}, probablemente debidas tanto a la variabilidad de la técnica de *Western blot* y cuantificación por densitometría, así como a las ligeras variaciones en la cantidad de PrP^{res} en cada inóculo y experimento, que resultan imposibles de igualar con precisión. Por tanto, los resultados de dilución seriada en que todas las PrP^{res} muestran una capacidad de propagación muy similar en PrP recombinante de conejo wt y la gran similitud de los patrones de resistencia a PK apuntan hacia la existencia de una sola cepa en PrP recombinante de conejo wt a pesar de proceder de PrP^{res} con distintas mutaciones. Sin embargo, a pesar de mostrar características bioquímicas similares tanto en dilución seriada como en lo concerniente a su resistencia a PK, no puede descartarse completamente la posible existencia de varias cepas, cuya distinción podría requerir su inoculación en modelos animales adecuados que aporten información sobre su infectividad, tiempos de incubación o patrones de deposición de PrP^{res}, imposibles de distinguir *in vitro*.

6. Estudio de la capacidad de propagación de PrP recombinantes de conejo con múltiples mutaciones de ratón

Dado que el principal interés del presente estudio consiste en detectar los aminoácidos clave en la resistencia al malplegamiento de la PrP de conejo, se centra la atención en el estudio de las tres mutaciones que causan una mayor susceptibilización de la PrP recombinante de conejo frente a RML.

Con la intención de saber si las mutaciones S107N, M108L e I202V podrían de forma conjunta o cooperativa eliminar totalmente la barrera interespecies entre ratón y conejo, se generaron todas las variantes de PrP recombinante de conejo con dos de las tres sustituciones y un triple mutante que incluye las tres sustituciones mencionadas en el contexto de la PrP recombinante de conejo. Así, en caso

de que cualquier combinación de estas mutaciones determinase la existencia de la barrera interespecies existente entre ratón y conejo, su presencia combinada, aún en el contexto de la PrP recombinante de conejo, debería permitir la propagación de recRML en una sola ronda de rec-PMCA.

Una vez más, la estrategia utilizada para esclarecer si los cambios mencionados pudieran de forma cooperativa ser las responsables de la resistencia de los conejos frente a priones murinos, fue la generación de las distintas PrP recombinantes con mutaciones y su utilización como sustratos de rec-PMCA complementados con encéfalo de ratón *PRNP*^{-/-}, tal y como se detalla en el apartado de Materiales y métodos. Igual que en experimentos previos y para que los resultados fueran comparables, se igualaron las cantidades de PrP recombinante de cada sustrato, como puede verse en la figura 22, entre los que se han incluido además de las PrPs con mutaciones dobles y las que contienen las tres mutaciones, los mutantes individuales y las PrP recombinantes wt tanto de ratón como de conejo como controles.

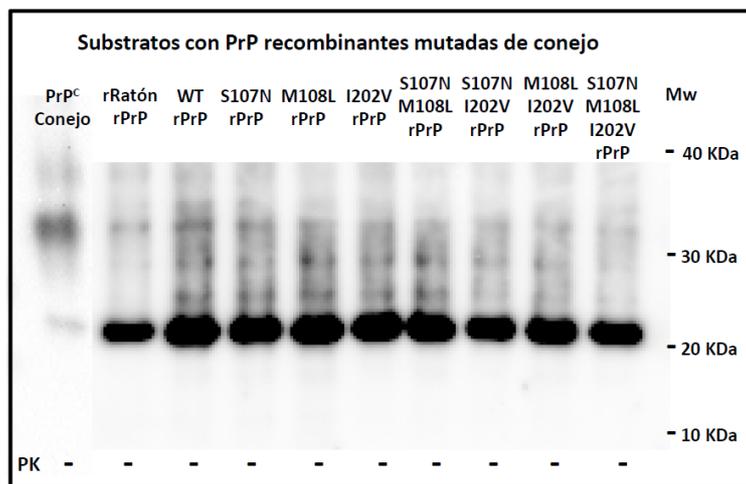


Figura 22. Western blot de los sustratos generados con las distintas PrP recombinantes mutadas de conejo. Se incluye también un homogenizado de encéfalo de conejo para ver la diferencia de tamaño respecto a las PrP recombinantes generadas. Las cantidades de PrP recombinante añadidas a cada sustrato fueron igualadas tras medición por *BCA protein Assay* y dilución en PBS. Revelado con el anticuerpo monoclonal 12B2.

Reproduciendo el experimento inicial en que toda la batería de PrP recombinantes de conejo mutadas se sometió a rondas seriadas de rec-PMCA, a cuatro tubos de cada uno de los 9 sustratos se añadió recRML como semilla a una dilución 1:10 y tras cada ronda de 24 horas de rec-PMCA, se volvía a diluir el producto de PMCA a 1:10 en sustrato fresco realizando así hasta un máximo de 10 rondas. En paralelo, se utilizaron además cuatro tubos sin semilla como control de posibles contaminaciones o

aparición espontánea de PrP^{res}. Igual que en anteriores experimentos, los resultados muestran la ronda de aparición de PrP^{res} y el porcentaje de tubos en que se detecta PrP^{res}.

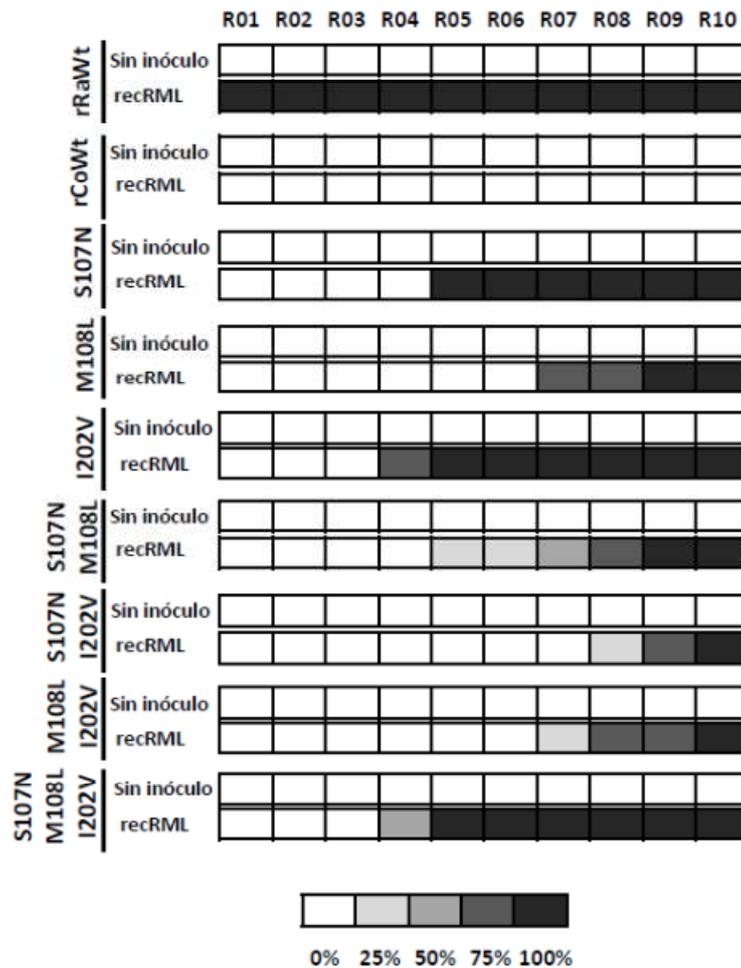


Figura 23. Representación gráfica de la aparición de PrP^{res} durante la propagación *in vitro* de recRML sobre las PrP recombinantes de conejo con sustituciones únicas y múltiples de ratón con el prion murino recombinante RML como semilla. Se han utilizado sustratos basados en PrP recombinante de ratón y conejo wt como controles positivo y negativo respectivamente. Evaluado tras análisis mediante *Western blot* de cada una de las rondas de rec-PMCA (señaladas como R01-R10) a las que fueron sometidos los sustratos. El porcentaje de tubos positivos tras cada ronda de rec-PMCA se ha señalado con distintas intensidades de grises, tal y como se indica en la leyenda inferior de la figura.

El número de rondas en las que aparece PrP^{res} por primera vez, es muy similar tanto para las proteínas que tienen una mutación puntual como para las que tienen múltiples mutaciones. Ni siquiera la PrP con la mutación triple, la más similar en secuencia al RML, muestra mayor capacidad de malplegamiento que mutantes simples como el S107N o el I202V, de forma que puede descartarse que

estas 3 posiciones de la PrP recombinante de conejo puedan tener un efecto cooperativo en la determinación de la barrera interespecies entre ratón y conejo. Además, las PrP recombinantes con combinaciones de 2 mutaciones dan lugar a PrP^{res} en rondas aún más tardías que las mutantes simples, sobre todo en presencia de la mutación I202V, sugiriendo que más que actuar de forma cooperativa podrían incluso reducir el efecto que puedan estar ejerciendo individualmente sobre la capacidad de malplegamiento de la PrP recombinante de conejo.

7. Refinando el papel de las sustituciones que más susceptible hacen la PrP recombinante de conejo al malplegamiento por RML

La necesidad de conocer en mayor detalle el papel que juegan las sustituciones realizadas en aquellas PrPs de conejo mutadas que han resultado más susceptibles al prion murino RML, llevó al planteamiento de la siguiente cuestión: ¿es la ausencia del aminoácido sustituido o la presencia del nuevo aminoácido el que vuelve al conejo susceptible a RML? Es decir, se pretendía aclarar si la ausencia del aminoácido original es suficiente para incrementar la susceptibilidad o el aminoácido por el que se sustituye resulta ser el factor más crítico. Para ello, se escogieron los tres mutantes que muestran una mayor susceptibilidad frente al RML, el S107N, el M108L y el I202V, aquéllos que pudieron ser malplegados tanto por recRML como por BrainRML y se decidió realizar una sustitución alternativa a cada mutación en la misma posición de la secuencia. A pesar de que se podría haber escogido cualquier aminoácido para realizar la sustitución alternativa, se optó por escoger el cambio en función de los aminoácidos que ya existen en esas mismas posiciones en otras especies de mamífero, como una forma de garantizar que la estructura general de la PrP mutada no sufriera alteraciones estructurales drásticas. Así, mediante alineamiento de las secuencias de PrPs de diversas especies, que se muestran en la figura 24, se identificaron los aminoácidos que pueden encontrarse en las citadas posiciones y se escogieron para realizar sustituciones alternativas que permitan estudiar el efecto local, suponiendo un cambio menor en la estructura global de la PrP.

Centrándose en las posiciones 107, 108 y 202 de la PrP de conejo y observando los aminoácidos que se encuentran en otras especies en esas mismas posiciones, puede verse que en el caso del 107, sólo aparece la Serina en el conejo y que el resto de especies presentan una Asparagina en esa posición, por lo que no se cuenta con alternativas para la sustitución inicial de S107N. No obstante, en lo concerniente a la posición 108, además de la Metionina que aparece en la PrP conejo y en la gran mayoría de especies y la Leucina que presenta la PrP de ratón, el topillo rojo presenta una Isoleucina en esa posición de

forma que se ha seleccionado la mutación alternativa M108I. También en el caso de la posición 202 en que la PrP de conejo presenta una Isoleucina igual que las PrPs de hámster, vaca, oveja y ciervo mula, puede encontrarse en otras especies una Valina, como es el caso del ratón, topillo rojo, caballo, cerdo y humano o por el contrario una Metionina como en el caso de las PrPs de perro, gato y visón. Así pues, para la posición 202 se escogió la sustitución alternativa I202M.

Una vez generadas las nuevas PrP recombinantes de conejo con las sustituciones alternativas y producir las PrP recombinantes, éstas se utilizaron para llevar a cabo experimentos idénticos a los realizados con las PrP mutadas de conejo iniciales. Es decir, se probó su susceptibilidad al malplegamiento por recRML y BrainRML de ratón mediante pases seriados de rec-PMCA, utilizando al igual que anteriormente cuadruplicados a los que se añade semilla a una dilución inicial de 1:10. Igualmente, se realizaron 20 rondas seriadas de rec-PMCA utilizando el mismo factor de dilución entre cada ronda e incluyendo también el mismo número de tubos sin semilla inicial como control.

Conejo	MKKRPKPGGGWNTGGSRYPGQSSPGGNRYPPQG-GGWGQPH-GGGWGQPHG-----G
RatónWNTG.....G.....T.....GSWGQPHG-
VoleWNTG.....G.....G.T.....GGWGQPHG-
HámsterWNTG.....G.....G.T.....GGWGQPHG-
OvejaG.....G.....
VacaG.....G.....GGWGQPHG-
CiervoG.....G.....
CaballoWNTG.....G.....G.....GGWGQPHG-
CerdoG.....G.....G
HumanoWNTG.....G.....G.....GGWGQPHG-
PerroWNTG.....G.....G.....GGWGQPHG-
GatoG.....G.....G.....A.....A.....G
Visón	..W.....G.....G.....G.....G
Conejo	GWGQPH-GGGWGQPHG-GGWGQG-GTHNQWKGKPSKPKTSMKHVAGAAAAGAVVGGGLGGYM
Ratón	-----S-----G-----N-----NI-----
Vole	-----G-----N-----NI-----
Hámster	-----G-----N-----N-----M-----
OvejaG.....S.S.N.....N.....
VacaG.....G.N.....N.....
CiervoG.....S.N.....N.....
CaballoG.....S.G.N.....N.....
CerdoG.....G.S.G.N.....N.....
Humano	-----G-----G.S.N.....N-----M-----
Perro	-----G-----G.S.S.....N.....N.....
GatoA.....AG.....G.....G.....N-----M-----
VisónG.....G.S.G.....N.....
Conejo	LGSAMSRPLIHFGNDYEDRYRYRENMYRYPNQVYYRFPVDQYSNQNSFVHDCVNIITVKQHTV
RatónM.....W.....N.....N.....N.....I.....
VoleM.....W.....N.....N.....N.....I.....
HámsterMM.....W.....N.....N.....N.....I.....
OvejaN.....
VacaS.....H.....N.....E.....
CiervoN.....T.....
CaballoSE.....N.....
CerdoS.....
HumanoI.....S.....H.....M.E.....N.....I.....
PerroE.....N.....R.....
GatoN.....R.....
VisónK.....N.....
Conejo	TTTTKGENFTETDIKIMERVVEQMCITQYQQESQAAYQRAAG
RatónV.M.....V...K...Y.DGRRS
VoleV.M.....V...K...Y.BGRSS
HámsterT...K...Y.DGRRS
OvejaR...Y...G.S
VacaM.....R...Y...G.S
CiervoM.....R...Y...G.S
CaballoV.....K.YE.FQ.G.S
CerdoV.MI.....K.YE.YA.G.S
HumanoV.M.....ER...Y...G.S
PerroM.....V...K...E.Y...G.S
GatoM.....V...K...E.Y...G.S
VisónM.....V...R...E.Y...K.G.S

Figura 24. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las PrP recombinantes de diversas especies de mamífero. Las secuencias de PrP recombinantes de conejo (*Oryctolagus cuniculus*), ratón (*Mus musculus*), bank vole (*Myodes glareolus*), hámster sirio (*Mesocricetus auratus*), oveja (*Ovis aries*, con polimorfismo ARQ), vaca (*Bos taurus*), ciervo mula (*Odocoileus hemionus*), caballo (*Equus ferus caballus*), cerdo (*Sus scrofa*), humano (*Homo*

sapiens, con polimorfismo M129M), perro (*Canis lupus familiaris*), gato (*Felis silvestris catus*) y visón (*Neovison vison*) fueron comparadas mediante alineamiento con ClustalW. Los aminoácidos idénticos a los de la secuencia de conejo se indican por un punto. Señaladas en verde se muestran las posiciones 107, 108 y 202, según la numeración de la PrP de conejo.

Los resultados, comparados con los obtenidos para las mutaciones originales, pueden observarse en la figura 25, que muestra el porcentaje de tubos en que aparece PrP^{res} en cada ronda de rec-PMCA.

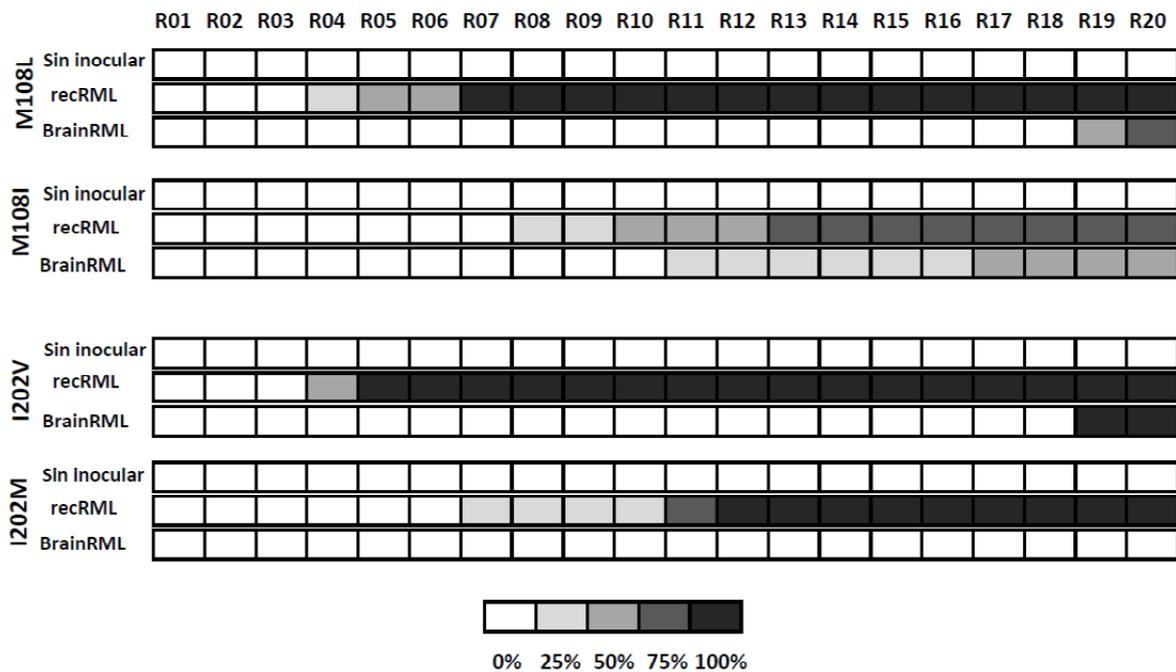


Figura 25. Representación gráfica de la aparición de PrP^{res} durante la propagación *in vitro* de las PrP recombinantes de conejo con sustituciones alternativas inoculadas con los priones murinos RML recombinante y proveniente de encéfalo de animales afectados. Evaluado tras análisis mediante *Western blot* de cada una de las rondas de rec-PMCA (señaladas como R01-R20) a las que fueron sometidos los sustratos. El porcentaje de tubos positivos tras cada ronda de rec-PMCA se ha señalado con distintas intensidades de grises, tal y como se indica en la leyenda inferior de la figura.

En el caso de la PrP con la mutación M108I, parece que la Isoleucina la hace tan susceptible como sucede con la Leucina de la sustitución M108L. Dado que tanto el recRML como el BrainRML son capaces de inducir el malplegamiento en ambos mutantes con pocas rondas de diferencia, 4 con recRML y 7 con BrainRML para la primera aparición de PrP^{res}, lo cual no es de extrañar teniendo en cuenta la gran similitud de ambos aminoácidos. Así pues, aunque estos resultados pudieran apuntar a que la ausencia

de Metionina en la posición 108 es el factor crítico para la susceptibilización de la PrP de conejo, no puede descartarse que en realidad, el factor más crítico sea la presencia de algún aminoácido ramificado como podrían ser la Leucina, Isoleucina o Valina.

En lo que concierne a la PrP con la mutación I202M, no es malplegada por BrainRML y el malplegamiento inducido por recRML es un poco más tardío, indicando una menor susceptibilidad del mutante I202M que la del mutante I202V frente a RML. De cualquier manera, el hecho de que ambos mutantes puedan malplegar apunta a que el factor crítico en esta posición para la elevada resistencia de la PrP de conejo al malplegamiento es la presencia de Isoleucina, puesto que su sustitución con aminoácidos similares en cuanto a la carga de su grupo lateral, que en los tres casos se incluyen en el grupo de aminoácidos apolares, es suficiente para hacerla susceptible al malplegamiento por RML. La mayor susceptibilidad del mutante I202V a RML bien podría explicarse porque la presencia del mismo aminoácido en la PrP del sustrato y del inóculo causa mayor reducción de la barrera interespecies (Moore, Vorberg et al. 2005), siendo la diferencia de un aminoácido más entre el mutante I202M y RML responsable de su menor susceptibilidad.

8. Estudio de la capacidad de las PrP recombinantes de ratón con mutaciones de conejo de bloquear la propagación del prion murino RML recombinante

Debido a al interés por conocer las posiciones y los residuos aminoacídicos más relevantes para la baja susceptibilidad al malplegamiento de la PrP de conejo mediante el estudio de la barrera interespecies entre ratón y conejo, se decidió generar una batería de PrP recombinantes mutadas de ratón, con las sustituciones de la PrP de conejo. Así, los 11 residuos aminoacídicos mutados en la PrP de conejo, se estudiaron en el contexto de la PrP de ratón, sustituyéndolos por los residuos que presenta la PrP de conejo en las mismas posiciones. La idea consistía en averiguar si alguna de las sustituciones que causan una mayor susceptibilidad al malplegamiento de la PrP recombinante de conejo podría en el contexto de ratón, aumentar la resistencia de la PrP recombinante murina al malplegamiento por RML. Aunque la barrera interespecies para la transmisibilidad de priones está condicionada por las diferencias en la secuencia aminoacídica, es bien conocido también que estas diferencias no son el único componente para las restricciones en la transmisibilidad de los priones. Más bien, parece regirse principalmente por propiedades conformacionales de la PrP^{res}, a lo cual afectan no sólo las diferencias aminoacídicas si no también la diversidad estructural que presentan las cepas de priones con una misma

secuencia aminoacídica (Hagiwara, Hara et al. 2013). No obstante, mediante la generación de los mutantes inversos, es decir, mutaciones de conejo en la PrP de ratón, se pretendía confirmar la importancia de las posiciones que dieron lugar a una mayor susceptibilidad de la PrP de conejo en caso de que se observe bloqueo de la capacidad de propagación del recRML en la PrP de ratón debido al cambio inverso o localizar otros posibles residuos clave en la barrera.

Para ello, se siguió un esquema experimental muy similar al utilizado con las PrP recombinantes mutadas de conejo. Tras generar, producir y purificar todas las versiones de PrP de ratón con sustituciones de conejo, se prepararon todos los sustratos dializando las proteínas recombinantes frente a PBS y se complementaron con un homogenizado al 10% en PBS (p/v) de encéfalos de ratones *PRNP*^{-/-}. Con el fin de comparar la capacidad de malplegamiento de los diferentes mutantes entre sí y con respecto al ratón wt, se trató de igualar la concentración de cada PrP recombinante (siempre en el rango de 50 a 100 ng/μl) mediante *BCA Protein Assay* y posterior análisis de los sustratos por electroforesis en geles de SDS-PAGE seguido por *Western blot*, que puede verse en la figura 26.

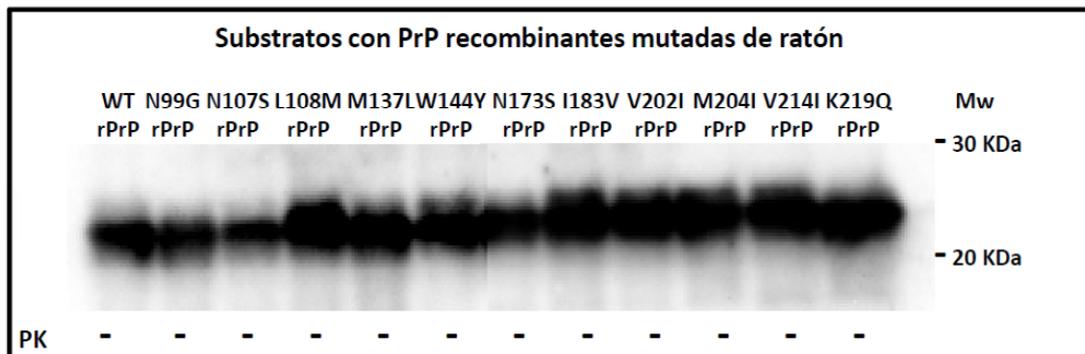


Figura 26. Western blot de los sustratos generados con las distintas PrP recombinantes de ratón con mutaciones de conejo. Las cantidades de PrP recombinante añadidas a cada sustrato fueron igualadas tras medición por *BCA protein Assay* y dilución en PBS. Revelado con el anticuerpo monoclonal Saf83.

A diferencia de los experimentos con las PrPs de conejo mutadas en las que se hicieron pases seriados con recRML, como la diferencia aminoacídica entre la PrP del inóculo y la del sustrato es en este caso de un solo residuo, se probó a realizar una prueba de propagación por dilución seriada del inóculo en una sola ronda de rec-PMCA. Así, se añadió recRML como semilla a 10 tubos de cada sustrato en diluciones seriadas a 1:10, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵, 1:10⁶, 1:10⁷, 1:10⁸, 1:10⁹ y 1:10¹⁰ y se sometieron a una ronda de 48 horas de PMCA. Los resultados de las tres réplicas realizadas pueden verse en la figura 27, junto con los *Western blot* de un experimento representativo del triplicado.

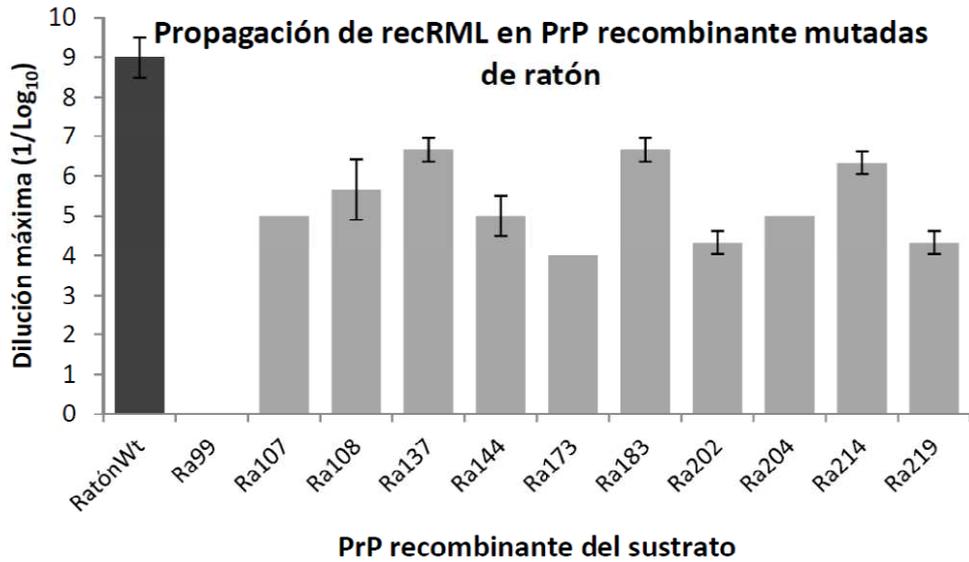
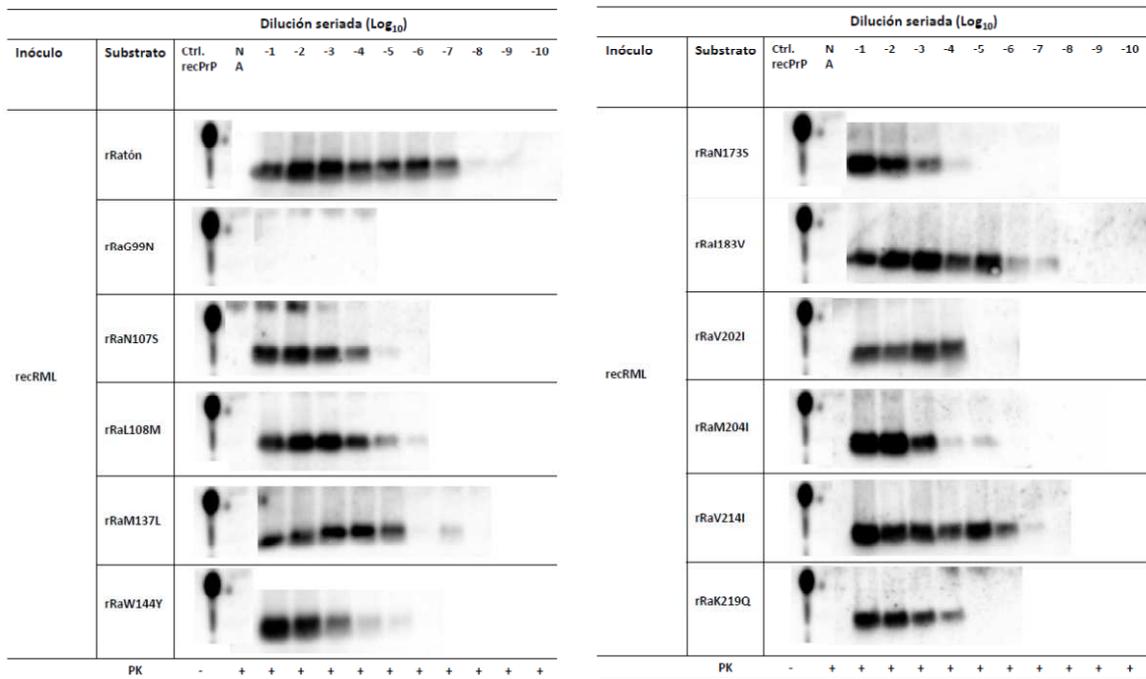
A**B**

Figura 27. Estudio de la capacidad de propagación del inóculo recRML de ratón sobre sustratos con PrP recombinantes de ratón con mutaciones de conejo. A) Representación gráfica de la media (incluyendo la desviación estándar de la media) de las diluciones máximas a las que pudo propagar el recRML en cada sustrato que contenía PrP recombinantes de ratón con sustituciones de conejo. En el eje horizontal se identifican la PrP recombinante de cada sustrato por la posición de la mutación. **B)** *Western blot* representativo de uno de los

experimentos de las 3 réplicas. El recRML fue diluido desde 1:10 hasta 1:10¹⁰ en los distintos sustratos y estos sometidos a una ronda de 48 horas de rec-PMCA. La primera columna indica el inóculo utilizado y la segunda la PrP recombinante del sustrato. En todos los casos se incluye un control del sustrato sin digerir y un control de la dilución 1:10 de recRML sin someter a rec-PMCA que se denomina no amplificado (NA) para distinguir señal de la semilla original de las realmente propagadas. Revelados con el anticuerpo monoclonal 12B2.

Aunque todas las PrP recombinantes de ratón con mutaciones de conejo presentan una barrera de transmisión para la propagación del recRML, ya que ninguna alcanza los niveles de propagación mostrados por la PrP de ratón wt, sólo la PrP con la mutación N99G bloquea completamente la propagación del inóculo recRML. Sin embargo, pudo observarse que utilizando este mismo sustrato con recRML añadido como semilla a dilución 1:10 y mediante rondas seriadas de rec-PMCA, aparece PrP^{res} en solo cuatro rondas de 24 horas (resultados no mostrados).

Si se comparan los resultados con los obtenidos para las PrP recombinantes mutadas de conejo, no se aprecia una correlación perfecta entre las posiciones que parecían hacer más susceptible a la PrP de conejo con las posiciones que hacen más resistentes a la PrP recombinante de ratón. Aunque en el caso del N99G, el mutante inverso en el contexto de PrP de conejo es uno de los que malplegó en menos rondas de PMCA con recRML como semilla, pudiendo explicarse así su capacidad para hacer menos susceptible la PrP de ratón al inóculo, esta correlación no se observa para la mayoría de las PrP recombinantes mutadas en ratón. Este es el caso, por ejemplo, de los que se han considerado los mutantes que más susceptible volvían la PrP de conejo al malplegamiento inducido por RML, es decir los de las mutaciones en las posiciones 107, 108 y 202. Al mutar estas mismas posiciones en ratón, la reducción en la capacidad de propagación de recRML observada es igual o incluso menor que para las PrP mutadas en posiciones que no parecían tan críticas en la susceptibilización de la PrP de conejo como los mutados en las posiciones 144, 173, 183 o 214. No obstante, cabe destacar que las mutaciones en estas últimas dos posiciones, que no tuvieron ningún efecto sobre la susceptibilidad de la PrP de conejo a RML, muestran a su vez la menor reducción de la capacidad de propagación de recRML en las PrP recombinantes de ratón I183V y V214I. Por tanto, aunque no se de una correlación perfecta, en algunas posiciones sí que parece existir cierta relación entre el efecto de esos cambios aminoacídicos en el contexto de la PrP de conejo y el efecto de las mutaciones inversas en el contexto de la PrP de ratón. Esto podría permitir establecer un criterio más, junto con los ya mostrados, para la identificación de posiciones o residuos aminoacídicos más relevantes para la determinación de la barrera interespecies.

9. Estudio de la capacidad de propagación de otros inóculos en sustratos basados en las PrP recombinantes mutadas de conejo más susceptibles a RML

Otra de las preguntas surgidas durante el estudio de las claves de la baja susceptibilidad del conejo a las enfermedades priónicas mediante la barrera de transmisión interespecies entre ratón y conejo, fue si las mutaciones más relevantes detectadas para la susceptibilización frente a RML, ejercían un efecto específico para la barrera estudiada o si en cambio, podrían estar causando una mayor facilidad para el malplegamiento por priones no sólo murinos. En el primero de los casos, el efecto de las sustituciones se debería únicamente a la similitud de las secuencias primarias entre las PrPs de ratón y conejo, mientras que en el segundo caso, estas posiciones podrían estar ejerciendo un efecto desestabilizante generalizado sobre la PrP recombinante de conejo.

Para probarlo, se realizaron una vez más, rondas seriadas de rec-PMCA con los sustratos que contienen las PrPs de conejo con las mutaciones seleccionadas S107N, M108L e I202V, añadiendo como semilla en este caso priones de origen ovino y bovino además de otro prion murino diferente a RML. Para la elección de los inóculos, se tuvo en cuenta además, que previamente hubieran podido malplegar la PrP de encéfalo de conejo (Chianini, Fernandez-Borges et al. 2012) pero que no hubieran sido capaces de malplegar la PrP de conejo recombinante (mostrado en el apartado 1), por lo que se decidió utilizar el prion de origen murino ME7, los priones scrapie SSBP/1 y EEB adaptado a oveja (sBSE, del inglés, *sheep Bovine Spongiform Encephalopathy*) de origen ovino y EEB (BSE) de origen bovino. Cada uno de ellos se añadió como semilla a 4 tubos de cada sustrato, incluyendo sustratos basados en PrP recombinantes de ratón y conejo wt como controles, a dilución 1:10 para rondas seriadas de 24 horas de PMCA diluyendo también el producto de cada ronda de PMCA en sustrato fresco a la misma dilución 1:10. Junto con los tubos inoculados utilizamos 4 tubos sin semilla inicial pero que también se sometieron a rondas seriadas de PMCA como control de contaminaciones o aparición espontánea de PrP^{res}. Igual que en experimentos previos y para reducir en lo posible la variabilidad debida a las diferencias de concentración de PrP recombinante en los sustratos, se ajustaron las concentraciones mediante *BCA protein Assay* y se confirmaron por *Western blot* tal y como se muestra en la figura 28. Sin embargo, en este caso no se igualó la cantidad de PrP^{res} presente en cada inóculo, puesto que más que comparar los inóculos entre sí, la intención es comparar la capacidad de propagación de cada inóculo en los diferentes sustratos.

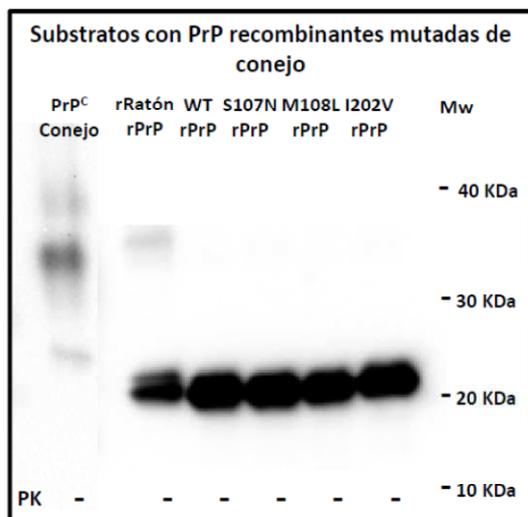


Figura 28. Western blot de los sustratos generados con las distintas PrP recombinantes mutadas de conejo. Se incluye también un homogenizado de encéfalo de conejo para ver la diferencia de tamaño respecto a las PrP recombinantes. Las cantidades de PrP recombinante añadidas a cada sustrato fueron igualadas mediante medición por *BCA protein Assay* y dilución en PBS. Revelado con el anticuerpo monoclonal 12B2.

Igual que en experimentos previos en que toda la batería de PrP recombinantes de conejo mutadas se sometió a rondas seriadas de rec-PMCA, a cuatro tubos de cada uno de los 5 sustratos se añadieron los distintos inóculos anteriormente mencionados como semilla a dilución 1:10 y tras cada ronda de 24 horas de rec-PMCA, se volvía a diluir el producto de PMCA a 1:10 en sustrato fresco realizando así hasta un máximo de 20 rondas. En paralelo, se utilizaron además cuatro tubos sin inocular como control de posibles contaminaciones o aparición espontánea de PrP^{res}. Igual que en anteriores experimentos, los resultados de la figura 29 muestran la ronda de aparición de PrP^{res} y el porcentaje de tubos en que se detectó PrP^{res}.

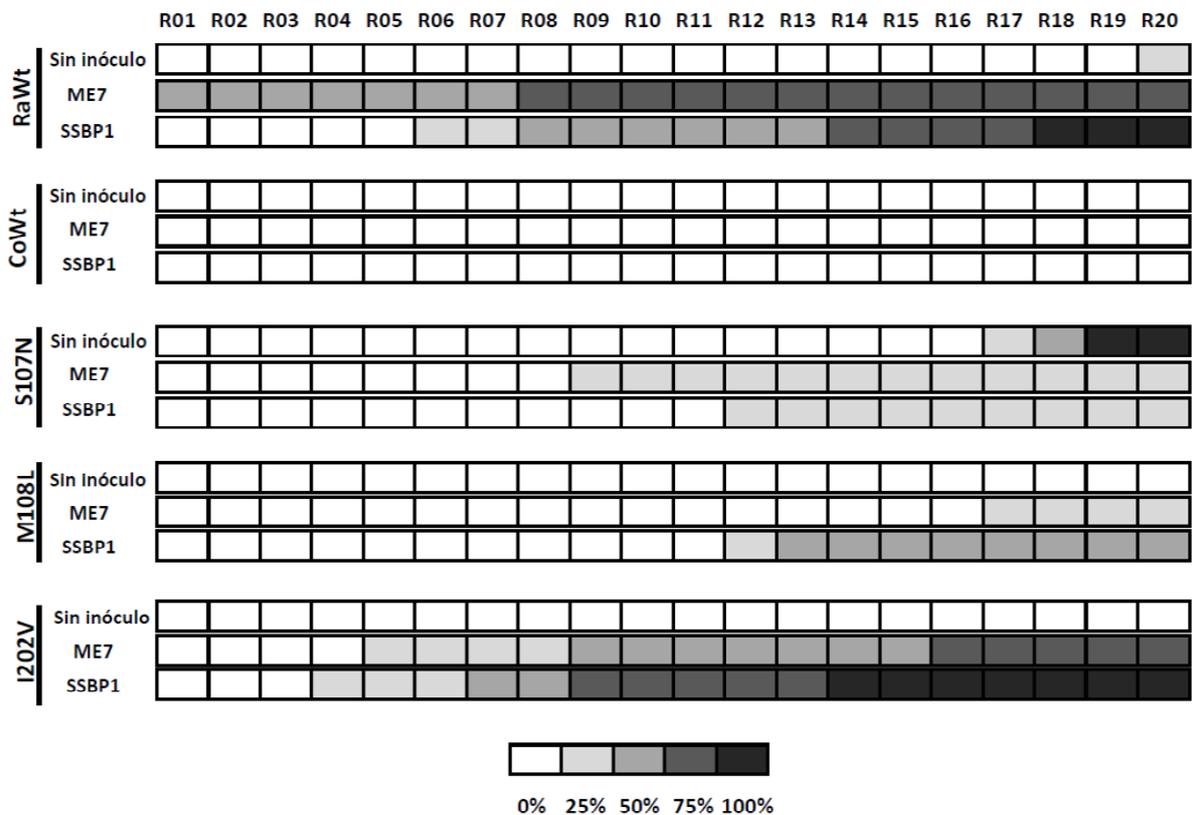


Figura 29. Representación gráfica de la aparición de PrP^{res} durante la propagación *in vitro* de los inóculos ME7 y SSBP1 sobre las PrP recombinantes de conejo mutadas más susceptibles a la propagación con el prion murino RML. Se han utilizado sustratos basados en PrP recombinante de ratón y conejo wt como controles positivo y negativo respectivamente. Evaluado tras análisis mediante *Western blot* de cada una de las rondas de rec-PMCA (señaladas como R01-R20) a las que fueron sometidos los sustratos. El porcentaje de tubos positivos tras cada ronda de rec-PMCA se ha señalado con distintas intensidades de grises, tal y como se indica en la leyenda inferior de la figura.

10. Análisis comparativo de la propensión a adquirir conformación estado- β de las PrP recombinantes de ratón, conejo y conejo I202V frente al tratamiento con agentes caotrópicos seguido por Dicroísmo circular

Viendo que el experimento anterior parece apuntar a una susceptibilidad general de las PrP recombinantes mutantes más susceptibles a RML, puesto que también se han revelado susceptibles a priones de origen ovino y bovino, surgió la pregunta de si la susceptibilidad causada por estas mutaciones puntuales podría deberse a una desestabilización de la conformación nativa de la PrP recombinante que facilitarían su malplegamiento. Aunque aún no se sabe si la estabilidad de la conformación nativa de determinada PrP está relacionada con la susceptibilidad a enfermedades priónicas que presenta dicha especie, se sabe que la formación de PrP^{Sc} implica un cambio estructural de

la PrP^C, mayoritariamente α -helicoidal, a una estructura mayoritariamente compuesta por hoja- β . Por tanto, la estabilidad de la estructura nativa de la PrP podría influir en su propensión al malplegamiento inducido por priones. Además, se sabe desde hace mucho, que bajo condiciones ligeramente desestabilizantes la PrP puede adquirir un estado mayoritariamente β -estructurado (denominado estado- β), que como propusieron Horneman y colaboradores podría tratarse de un intermediario entre los estados nativo y desplegado en la vía de plegamiento de la PrP ((Zhang, Stockel et al. 1997), (Hornemann and Glockshuber 1998)). Poco más tarde, Baskakov y colaboradores mostraron que el estado- β de la PrP estaba compuesto mayoritariamente por formas oligoméricas (Baskakov, Legname et al. 2001) que posteriormente se determinaron como predominantemente octaméricas al menos para las PrPs de ratón y hámster ((Baskakov, Legname et al. 2002), (Sokolowski, Modler et al. 2003)). A pesar de la controversia acerca de la existencia de monómeros β -estructurados ((Baskakov, Legname et al. 2001), (Gerber, Tahiri-Alaoui et al. 2008)), un estudio realizado recientemente por Qasim Khan y colaboradores demuestra que pequeños cambios en una solución de PrP, como la adición de agentes caotrópicos, tiene gran influencia sobre la fracción de PrP que adquiere estado- β , proponiendo esta propensión a la adquisición de estado- β como determinante para la susceptibilidad de dicha especie de mamífero a enfermedades priónicas.

En este estudio, desarrollaron un método para la medición cuantitativa de la propensión de determinada PrP a adquirir el estado- β mediante DC en presencia de concentraciones crecientes de un agente desnaturalizante en entornos ligeramente ácidos. Así, pudieron comparar la propensión de las PrP recombinantes de hámster, ratón, conejo, perro y caballo a adquirir el estado- β y correlacionarlo con la susceptibilidad que presenta cada especie a las enfermedades priónicas. Mediante la medición de las transiciones estructurales inducidas en la PrP por adición de urea utilizando el DC a dos longitudes de onda, vieron que las PrP de las 5 especies podían presentar al menos 3 estados conformacionales distintos (nativo, desplegado y estado- β intermedio) y que la mayor propensión a adquirir el estado- β en pH menos ácidos se correlacionaba con una mayor susceptibilidad a las enfermedades priónicas (Khan, Sweeting et al. 2010).

El método desarrollado por Qasim Khan y colaboradores, parte de que la existencia de la mezcla de monómeros y octámeros descrita por Baskakov hace que un modelo simple de 3 estados (nativo, desplegado y estado- β) resulte inadecuado para el análisis de las curvas bifásicas de desplegamiento de PrP inducido por urea, mientras que un modelo de equilibrio de 4 estados (nativo, desplegado, estado- β monomérico y estado- β oligomérico) con su mayor complejidad, también dificultaría considerablemente

un ajuste adecuado. Por ello, se decidieron por una aproximación que no hace suposiciones sobre el estado de oligomerización de las PrPs y se aprovecha de que el estado- β de la PrP presenta un espectro de DC característico de hoja- β y distinto del espectro α -helicoidal de la PrP nativa o del tipo *random coil* que presenta la PrP desplegada. Como un espectro de DC es la suma de las contribuciones de todas las moléculas proteicas presentes en sus conformaciones particulares, se puede expresar la elipticidad molar (θ) observada de determinada muestra mediante la siguiente ecuación:

$$\theta_{220,obs.} = \theta_{220,nativa}[Nativa] + \theta_{220,estado\beta}[Estado\beta] + \theta_{220,desplegada}[Desplegada]$$

Donde [Nativa], [Estado- β] y [Desplegada] son las fracciones de PrP en cada estado y $\theta_{220,xxx}$ son las elipticidades molares correspondientes a cada conformación. Esto puede simplificarse normalizando los datos de DC a fracciones aparentes, donde los valores de las fracciones aparentes nativa y desplegada serían 1 y 0 respectivamente:

$$\frac{\theta_{220,obs.} - \theta_{220,desplegada}}{\theta_{220,nativa} - \theta_{220,desplegada}} = \frac{\theta_{220,nativa} - \theta_{220,desplegada}}{\theta_{220,nativa} - \theta_{220,desplegada}} [Nativa] + \frac{\theta_{220,estado\beta} - \theta_{220,desplegada}}{\theta_{220,nativa} - \theta_{220,desplegada}} [Estado\beta] + \frac{\theta_{220,desplegada} - \theta_{220,desplegada}}{\theta_{220,nativa} - \theta_{220,desplegada}} [Desplegada]$$

Quedando la ecuación de la siguiente forma:

$$F_{ap220} = [Nativa] + Z_{220}[Estado\beta]$$

Donde F_{ap220} es la señal observada en DC normalizada, Z_{220} es la señal del estado- β a 220 nm en DC normalizada y [Nativa] y [Estado- β] son las concentraciones fraccionales de la conformación nativa y del estado- β respectivamente.

Para despejar [Estado- β], siguen el desplegamiento de PrP a una segunda longitud de onda, lo que permite establecer un sistema de 2 ecuaciones. Para ello, la señal normalizada de Z_{λ} para el estado- β debe ser diferente de Z_{220} y también diferente de las señales de DC de las formas nativa y desplegada. Basándose en los espectros de DC para una misma PrP en estado nativo, en estado- β y totalmente desplegada, seleccionaron la longitud de onda de 229 nm de donde sale la segunda ecuación necesaria:

$$F_{ap229} = [Nativa] + Z_{229}[Estado\beta]$$

Así, se obtienen dos curvas de desnaturalización para cada PrP en medios con diferente grado de acidez y combinando las ecuaciones de cada curva a las diferentes longitudes de onda, se puede resolver la fracción que se encuentra en estado- β para cada PrP a un pH determinado:

$$[Estado\beta] = \frac{(F_{ap220} - F_{ap229})}{(Z_{220} - Z_{229})}$$

Se decidió aplicar esta técnica para averiguar si, al igual que Qasim Khan y colaboradores hicieron para las PrPs de diferentes especies, puede correlacionarse la susceptibilidad que muestra la PrP recombinante de conejo con la mutación I202V, que se ha mostrado como la más susceptible a distintos priones, con su propensión a adquirir el estado- β . También se han incluido en el estudio las PrP recombinantes de hámster, como control de la técnica, y de ratón y conejo wt para compararlos con la PrP recombinante de conejo I202V. Por dificultades técnicas, el estudio se realizó con cloruro de guanidina (GndCl) en lugar de urea como agente desnaturante, ya que con urea se necesitan hasta 8 M para la desnaturalización completa mientras que con el GndCl es suficiente con 4 M, lo que permitía una mayor dilución de la PrP recombinante facilitando igualar la concentración de PrP recombinante en cada muestra. Por tanto, en primer lugar se comprobó que el efecto observado con GndCl fuera igual al que se observa mediante desnaturalización con urea, utilizando para ello la PrP de hámster recombinante de la que se hicieron hecho curvas de desnaturalización tanto en presencia de urea como de GndCl a pH 4, pH 4.5 y pH 5 tal y como se detalla en el apartado 11 de Materiales y métodos. Los resultados ya extraídos siguiendo las ecuaciones presentadas anteriormente se muestran en la figura 30.

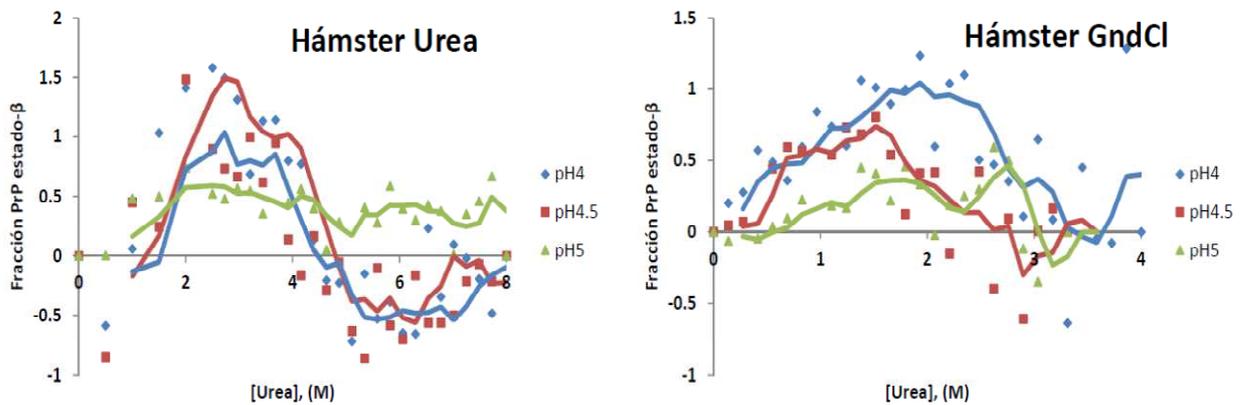


Figura 30. Representación gráfica de la fracción de PrP recombinante de hámster que adquiere conformación de estado- β al ser sometida a concentraciones crecientes de urea y GndCl a pH4, pH4.5 y pH5. En el eje vertical se describe la fracción de PrP recombinante que adquiere conformación de estado- β . En el eje horizontal se muestra la concentración del agente caotrópico utilizado en cada caso. Las medidas se tomaron a pH4, pH4.5 y pH5 puesto que la propensión a adquirir estado- β es mayor a pHs más ácidos.

Esta figura muestra los resultados de la comparación entre urea y GndCl como agentes desnaturalizantes. Tal y como puede verse, el patrón de propensión a adquirir el estado- β es muy similar en ambos casos, con gran parte de la PrP en estado- β a pH 4 y pH 4.5 entre 2 M y 4 M en el caso de la urea y entre 1 M y 2 M en el caso del GndCl. Cabe destacar además, que los resultados son muy similares a los obtenidos por Qasim Khan y colaboradores, salvo que ellos detectan también cierta propensión a adquirir estado- β a pH 5, mientras que en nuestro caso no resulta tan evidente, indicando que en nuestras manos, el método podría ser ligeramente menos sensible. Dado que el método funciona y que podía usarse cualquiera de los dos agentes caotrópicos, las curvas de desnaturalización de las PrP recombinantes de ratón, conejo y conejo1202V se hicieron en presencia de GndCl a estos mismos valores de pH. La figura 31 muestra la fracción de cada PrP recombinante testada que adquiere el estado- β , agrupadas por pH.

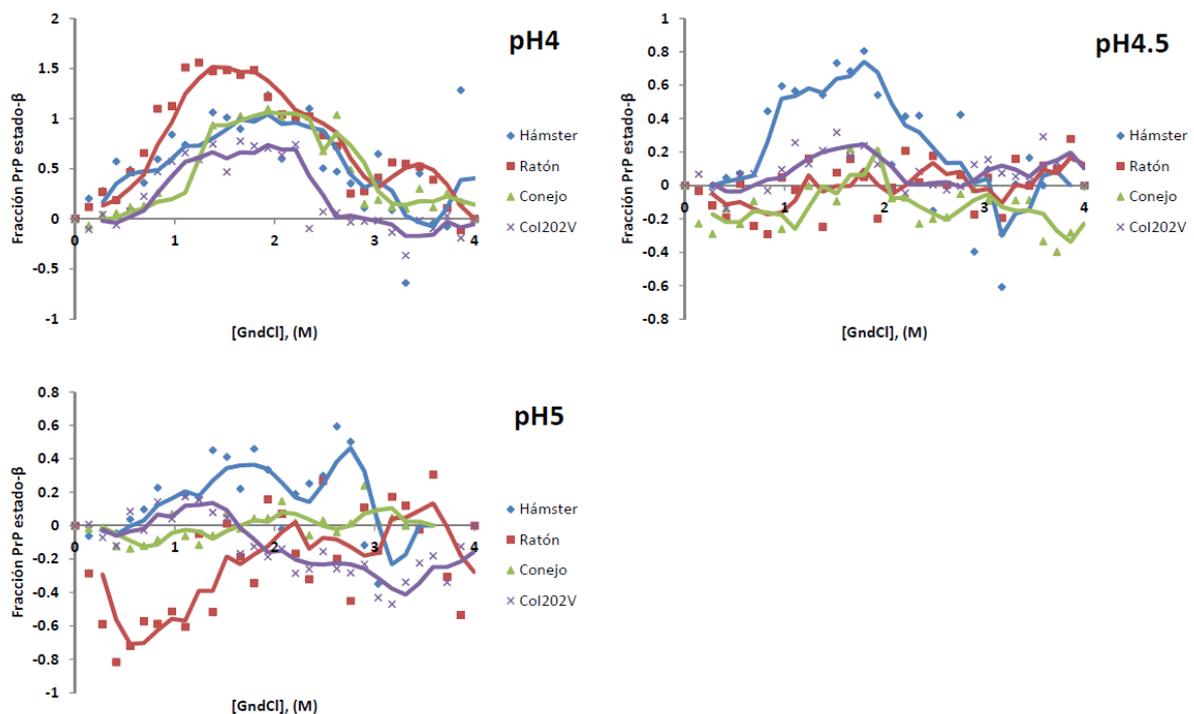


Figura 31. Representación gráfica de la comparación de las fracciones de cada PrP que adquieren conformación de estado- β al ser sometidas a concentraciones crecientes de GndCl a pH4, pH4.5 y pH5. En el eje vertical se describe la fracción de PrP recombinante que adquiere conformación de estado- β . En el eje horizontal se muestra la concentración del agente caotrópico utilizado en cada caso. Las mismas medidas se tomaron a pH4, pH4.5 y pH5 para cada PrP distinta y se agrupan por pH, puesto que las PrP recombinantes que mayor propensión muestran a adquirir conformación de estado- β son aquellas que a pH menos ácidos muestran PrP en dicho estado.

A pH 4 todas las PrPs muestran una gran propensión a adquirir el estado- β pero a pH 4.5 y pH 5 sólo la PrP recombinante de hámster mantiene dicha propensión, señalándola como la PrP más susceptible a adquirir estado- β y por consiguiente a ser malplegada por priones. Sin embargo, no pueden apreciarse diferencias entre las PrP recombinantes de ratón, conejo y conejo I202V, por lo que podría decirse que la susceptibilidad que muestran las PrP recombinantes de ratón y conejo I202V respecto a la PrP de conejo wt no se debe a una mayor propensión a adquirir estado- β . Particularmente, en el caso de la PrP recombinante de conejo con la mutación I202V el mecanismo por el que resulta más susceptible al malplegamiento que la PrP recombinante de conejo wt a priones de distintos orígenes, sería independiente a su propensión a adquirir estado- β , indicando que más que un efecto global en la vía de plegamiento, la susceptibilización podría ser debida a cambios estructurales más sutiles y locales.

DISCUSIÓN

La principal idea tras el desarrollo de esta tesis doctoral consistía en descifrar los mecanismos moleculares que podrían determinar la baja susceptibilidad a enfermedades priónicas de una de las especies considerada durante mucho tiempo resistente a las mismas, mediante las posibilidades que ofrece la técnica de propagación *in vitro* de PrP recombinantes malplegadas, la rec-PMCA.

Se habla de especies consideradas resistentes a enfermedades priónicas, porque evidencias muy recientes han puesto en entredicho la existencia del propio concepto de especie resistente a EETs. Como ya se ha comentado extensamente durante la Introducción, la transmisibilidad interespecies de EETs (Gajdusek, Gibbs et al. 1966) y la existencia de barreras de transmisión interespecies que limitan la capacidad de un determinado prion para causar enfermedad en una especie diferente a la de origen (Dickinson 1976), se conocen prácticamente desde los inicios de la investigación de EETs. El potencial zoonótico derivado de la transmisibilidad entre especies, así como la descripción de posibles transmisiones ocurridas en la naturaleza, impulsó la investigación en esta área, realizándose principalmente transmisiones experimentales en modelos animales, en los que la barrera de transmisión se manifiesta como una prolongación del tiempo de incubación y/o una tasa de ataque incompleta en la nueva especie inoculada (Hill and Collinge 2004). Aunque a lo largo de los años se han propuesto diversos factores que podrían determinar dicha barrera, el único realmente probado es el inicialmente propuesto por Dickinson y colaboradores, que sugirieron que un gen (al que denominaron *Sinc*) propio del hospedador regulaba el tiempo de incubación y la susceptibilidad del mismo a EETs (Dickinson, Meikle et al. 1968). Más tarde, se confirmó que el gen *Sinc* era en realidad el gen que codifica la PrP, conocida como *PRNP*, y por consiguiente que eran diferencias aminoacídicas en la secuencia primaria de la PrP lo que determina la susceptibilidad a EETs (Moore, Redhead et al. 1995). En paralelo a los avances en biología molecular, que centraban la atención en las secuencias de PrP de las especies implicadas, y gracias también en parte a los estudios de transmisión, la lista de EETs y de animales susceptibles a los mismos fue en aumento. No obstante, también se describieron animales aparentemente resistentes a las enfermedades priónicas, bien porque no sucumbían a las inoculaciones experimentales ((Gibbs and Gajdusek 1973), (Barlow and Rennie 1976)), como en el caso de los conejos, o bien porque no se habían reportado casos de infecciones naturales, incluso habiendo sido probablemente expuestos a los mismos alimentos contaminados por EEB durante la conocida epidemia de Reino Unido, como en el caso de los cánidos (Polymenidou, Trusheim et al. 2008). Así mismo, algunos experimentos con modelos celulares también parecían respaldar la supuesta resistencia de estas especies a EETs ((Vorberg, Groschup et al.

2003), (Polymenidou, Trusheim et al. 2008)). Sin embargo, el desconocimiento de los factores implicados en la determinación de las barreras interespecies, más allá de las diferencias de secuencia primaria entre las PrP del donante y del receptor, desaconsejaban y hacían imposibles las generalizaciones sobre la susceptibilidad o resistencia de una determinada especie a infecciones priónicas. Ya sólo la existencia de diversas cepas que muestran tropismo por diferentes especies y tejidos, con diferentes tiempos de incubación y manifestaciones clínicas, así como capacidad de adaptación al ser transmitidas a otras especies, podría resultar en que simplemente no se haya dado con la cepa adecuada a la que las especies supuestamente resistentes sean susceptibles (Chianini, Fernández-Borges et al. 2013). Otros factores como un prolongado tiempo de incubación respecto a la vida media del animal, la ruta de infección (Beringue, Herzog et al. 2012) o la posible existencia de cofactores aún desconocidos que podrían influir en la eficiencia de propagación de un determinado prion en una especie en particular (Deleault, Kascsak et al. 2010), también podrían haber llevado a considerar erróneamente estas especies como resistentes. Inicialmente, los estudios de transmisibilidad y evaluación de resistencia o susceptibilidad estuvieron muy limitados debido a los modelos disponibles, ya que se contaba únicamente con modelos naturales de infección. El desarrollo de animales transgénicos, mayoritariamente ratones que podían expresar toda una batería de PrP diferentes, supuso un gran avance en este sentido permitiendo la evaluación de nuevas barreras de transmisión y la confirmación de otras previamente estudiadas. Este es el caso por ejemplo, de los estudios de campo llevados a cabo en ganado ovino y caprino que presentan diversas PrP polimórficas para establecer la susceptibilidad de cada uno frente a scrapie, que fueron confirmados posteriormente en ratones transgénicos que expresan las distintas variantes genéticas ovinas o caprinas (Vilotte, Soulier et al. 2001). A pesar del avance que supuso el desarrollo de animales transgénicos, como técnica *in vivo* sigue requiriendo elevados tiempos de incubación que requieren largos periodos de estabulación en instalaciones de bioseguridad muy costosas, por lo que se han ido desarrollando nuevos modelos que permitan el estudio de las barreras de transmisión, la evaluación de susceptibilidad o resistencia al malplegamiento que presentan determinadas PrPs y las regiones que podrían determinar el grado de susceptibilidad.

En las últimas décadas se han desarrollado diversos modelos celulares tanto de cultivos primarios como de líneas establecidas y aunque inicialmente presentaban una capacidad de propagación limitada a cierto rango de cepas, generalmente de origen murino por la procedencia de las células (Fernandez-Borges, Erana et al. 2013), esta limitación va resolviéndose mediante el desarrollo de nuevas líneas celulares. Gracias, entre otros, al uso de cultivos primarios derivados de animales

transgénicos, a la expresión de PrP^C heterólogas en líneas celulares establecidas, así como al descubrimiento de nuevas líneas celulares no necesariamente provenientes del SNC. Estas últimas, son capaces de sustentar una infección priónica mediante expresión de PrP^C de determinadas especies, como es el caso de la línea celular epitelial RK13 proveniente de epitelio renal de conejo (Sakudo, Nakamura et al. 2007). No obstante, a pesar de todos estos avances, los modelos *ex vivo* siguen presentando limitaciones principalmente porque la susceptibilidad de una determinada línea celular solo puede determinarse empíricamente. Por razones desconocidas, la mayoría de las líneas que expresan PrP^C no sustentan la propagación de priones y además, las cepas priónicas presentan un estricto tropismo, razón por la cual diversas cepas nunca han podido ser propagadas *ex vivo* (Kraus, Groveman et al. 2013).

Otro importante grupo de metodologías ampliamente utilizadas para evaluar barreras de transmisión son los sistemas de propagación *in vitro*, entre los que destaca la PMCA. Tal y como se comentaba en la Introducción, al replicar esta técnica la propagación de priones que podría suceder *in vivo* pero con una cinética acelerada y al ser capaz de propagar priones manteniendo las propiedades de cepa, resulta una herramienta muy útil para evaluar barreras de transmisión (Fernandez-Borges, de Castro et al. 2009). Su correlación con lo que sucede *in vivo* ha sido demostrada en diversas ocasiones, como por ejemplo en el caso de las cepas generadas en PrP de cévido a partir del mismo prion murino, denominado RML (del inglés, *Rocky Mountain Laboratory*), mediante PMCA e *in vivo*, que muestran propiedades idénticas al ser inoculados en animales (Green, Castilla et al. 2008). Así, la PMCA permite el uso de un gran número de diferentes cepas de priones sobre diversas PrP polimórficas y testar así barreras de transmisión difíciles de evaluar *in vivo* (Fernandez-Borges, de Castro et al. 2009). La necesidad de material encefálico que contenga la PrP a estudiar ha limitado el uso de esta técnica a aquellos polimorfismos frecuentes y con fácil acceso en la naturaleza, lo que ha sido superado recientemente gracias a la utilización de proteína recombinante, de fácil preparación en el laboratorio, como sustrato en la variante denominada rec-PMCA (Wang, Wang et al. 2010).

Precisamente de la mano de la técnica de PMCA ha podido refutarse el concepto de especies resistentes a la infección priónica, debido a la gran eficiencia que presenta al propagar priones superando barreras de transmisión que no habían podido superarse ni siquiera *in vivo* en animales transgénicos con sobreexpresión de PrP, que suele facilitarlos (Sigurdson, Manco et al. 2006). De hecho, la gran eficiencia de la PMCA requiere el establecimiento de parámetros controlados empíricamente respecto a un estándar. Principalmente, en lo que se refiere a número de sonicaciones en cada ronda de

PMCA y número de rondas seriadas, para evitar la probable conversión de cualquier PrP^C en PMCA siempre que se utilicen las semillas adecuadas y suficiente número de rondas (Fernandez-Borges, de Castro et al. 2009). Precisamente, mediante el uso de homogenizados de encéfalo de conejo como sustrato de PMCA, se consiguió malplegar tanto de manera espontánea como por adición de diversas cepas, la PrP^C de conejo a PrP^{res} que posteriormente causó enfermedad priónica *in vivo* al ser inoculados intracerebralmente en conejos (Chianini, Fernandez-Borges et al. 2012). Aun así, los tiempos de incubación resultaron muy prolongados respecto a otras especies, impidiendo el cálculo de la tasa real de infección, que es aparentemente baja posiblemente debido a que el tiempo de incubación excede el de vida media del animal (Chianini, Fernández-Borges et al. 2013). Así pues, a pesar de haberse demostrado su susceptibilidad, ésta parece ser particularmente baja dados los largos tiempos de incubación que mostraron los animales infectados experimentalmente y teniendo en cuenta la ausencia de casos descritos en la naturaleza. A pesar de haber demostrado la susceptibilidad de los lepóridos a las enfermedades priónicas, el limitado éxito de las inoculaciones *in vivo*, parecía señalar hacia otros factores desconocidos e independientes de la PrP que podrían explicar la baja susceptibilidad de los conejos a las enfermedades priónicas. Pero la existencia de estos factores independientes de PrP^C que podrían existir en conejos y otras especies consideradas resistentes, ha sido refutada recientemente utilizando también animales transgénicos. En este caso, se generaron conejos transgénicos que expresan una PrP ovina altamente susceptible a scrapie (PrP^C ovina con polimorfismo VRQ) junto con el gen endógeno de conejo. Mediante inoculación de estos animales con cepas de scrapie, pudieron constatar que los animales eran completamente susceptibles a dicha enfermedad y además sin interferencia aparente por parte de la PrP endógena, que no se encuentra en las placas amiloideas de los encéfalos de los animales infectados (Sarradin, Viglietta et al. 2015).

Por tanto, aunque queda claro que la PrP^C de conejo puede ser malplegada a PrP^{Sc}, también es evidente su baja susceptibilidad a enfermedades priónicas, lo que condujo al planteamiento de la presente tesis doctoral, que pretende ahondar en las regiones de la PrP de conejo que podrían explicar su relativamente elevada resistencia al malplegamiento. El interés en introducir mutaciones en la PrP de conejo para el estudio de las regiones que podrían ser determinantes para su capacidad de propagación, llevó a la elección de la rec-PMCA como técnica de evaluación. Como ya se ha explicado en el apartado 1 de Resultados, para ello es necesario obtener primero PrP^{res} recombinantes con capacidad de inducir malplegamiento en otras PrP recombinantes. Así que, tal y como se hizo para la obtención de PrP^{res} de conejo con sustrato basado en homogenizado de encéfalo y como se ha hecho también con éxito para la obtención de priones recombinantes en otras especies como topillo rojo, ratón, hámster u oveja (ref.

tesis SER y CHF), se decidió tratar de malplegar PrP recombinante de conejo de la misma forma mediante adición de diversas cepas como semilla y pases seriados de rec-PMCA.

Sorprendentemente, y a pesar de haber utilizado diversas cepas (mostradas en la Tabla 1 de Resultados) que habían sido capaces de malplegar la PrP de encéfalo de conejo en menos de 10 rondas seriadas de PMCA, no se consiguió malplegar la PrP recombinante de conejo ni siquiera tras 20 rondas de rec-PMCA. Es más, las rondas seriadas de PMCA con encéfalo de conejo también dieron lugar a la aparición espontánea de PrP^{res}, fenómeno que tampoco pudo reproducirse en rec-PMCA a pesar de los múltiples intentos realizados. Inicialmente, se achacaron estas diferencias a que a la barrera interespecies existente entre las distintas secuencias primarias de PrP de inóculos y sustrato, igual que la observada en el estudio de Chianini y colaboradores, se le sumaba la barrera debida a las diferencias entre las PrP de encéfalo y recombinantes. Tal y como se adelantaba en la Introducción, aunque la PrP recombinante utilizada en rec-PMCA presenta importantes diferencias respecto a la PrP^C de encéfalo, como son un tamaño menor debido a la ausencia de péptido señal en el extremo amino terminal, la ausencia de glicosilaciones y del anclaje a membrana mediante GPI, las estructuras secundarias y terciarias son muy similares a la de la PrP de encéfalo (Hornemann, Schorn et al. 2004). Como la rec-PMCA es una técnica desarrollada muy recientemente, aún no ha podido aclararse el efecto de barrera que podrían ejercer estas diferencias en la propagación de malplegamiento de una cepa proveniente de encéfalo en sustrato basado en PrP recombinante. La existencia de algún tipo de barrera es evidente en cuanto a que se necesitan varias rondas seriadas de rec-PMCA para inducir el malplegamiento de prácticamente todas las PrP recombinantes para las que se ha obtenido PrP^{res} por adición de cepas provenientes de encéfalo, incluso sin ninguna diferencia aminoacídica entre las PrP de la semilla y el sustrato. En nuestro laboratorio se han obtenido así PrP^{res} recombinantes bioquímicamente distinguibles de ratón por adición como semilla de los priones murinos RML, 301C y 22L tras un número variable de rondas seriadas de rec-PMCA (ref. tesis SER). También diversas PrP ovinas con polimorfismos naturales pudieron ser malplegadas a PrP^{res} por una cepa de scrapie proveniente de ratones transgénicos que expresan PrP ovina y por una cepa de EEB proveniente de los mismos animales, aunque incluso en el mejor de los casos se requirieron más de 10 rondas seriadas de rec-PMCA (ref. tesis CHF). Desgraciadamente, aún no pueden encontrarse prácticamente estudios de transmisión realizados mediante rec-PMCA y la mayoría de investigaciones que aplican dicha técnica o bien no reportan si se requirió más de una ronda de PMCA para la obtención de PrP^{res} recombinante (Kim, Cali et al. 2010), o bien se basan en el malplegamiento espontáneo de la PrP recombinante ((Makarava, Kovacs et al. 2010), (Wang, Wang et al. 2010), (Yuan, Yang et al. 2015)), impidiendo la observación de la posible barrera

mencionada entre PrP^C de encéfalo y PrP recombinante. Sin embargo, cabe destacar unos pocos estudios en los que se trata de determinar la relevancia de las glicosilaciones y el GPI en la propagación por PMCA y que podrían ayudar a esclarecer las razones de las diferencias observadas en nuestros resultados. Los primeros estudios en los que se compara la capacidad de propagación de una PrP^C de encéfalo frente PrP recombinante en PMCA, surgen de la intención de comprobar si las diferentes glicofomas de PrP podrían regir la especificidad de conversión en PMCA, viendo que los patrones de glicosilación para las distintas cepas se conservan en pases seriados tanto *in vitro* (Castilla, Morales et al. 2008) como *in vivo* (Collinge, Sidle et al. 1996). Partiendo de esta base, Nishina y colaboradores generaron distintos sustratos de PMCA con: i) PrP^C purificadas de encéfalo de ratón y hámster, ii) estas mismas PrP^C pero tratadas con PNGasa para eliminar glicosilaciones y iii) PrP recombinante expresada en *E.coli*, todas complementadas con encéfalo de ratones *PRNP*^{-/-}. Observaron, que ninguna de las recombinantes era capaz de propagar cepas provenientes de encéfalo en hasta 5 rondas seriadas de PMCA, mientras que para las PrP^C purificadas podía conseguirse propagación en una sola ronda aunque cada especie presentara especificidad para sustrato glicosilado o no glicosilado (Nishina, Deleault et al. 2006). Además de las glicosilaciones, también el efecto de la ausencia de GPI para la propagación *in vitro* se ha estudiado mediante PMCA. En un estudio publicado por Kim y colaboradores, se mostraba cómo la ausencia de GPI, tanto en PrP recombinante como en purificada de encéfalo y tratada con PI-PLC (*phosphatidylinositol-specific phospholipase C*) impedía la formación de PrP^{res} en PMCA en hasta 4 rondas seriadas, mientras que la PrP^C con GPI era capaz de propagar el inóculo en una sola ronda (Kim, Surewicz et al. 2009). No obstante, este mismo grupo pudo malplegar la misma PrP recombinante poco más tarde por PMCA, dando lugar a priones infecciosos aunque tras 9 rondas seriadas y sin que estas conserven características propias de la semilla al ser propagadas *in vitro*, fenómeno que achacan a la ausencia de GPI que podría ser relevante para mantener las propiedades de cepa (Kim, Cali et al. 2010). También apuntan en este sentido, los estudios realizados por Imamura y colaboradores y Fabuary y colaboradores, que utilizan PrP recombinante expresada en células de insecto infectadas con baculovirus, que dan lugar a una PrP recombinante con glicosilaciones y GPI similar a la de encéfalo. Utilizándolo como sustrato complementado con encéfalo de ratón *PRNP*^{-/-} consiguen propagar en una sola ronda de PMCA inóculos en PrP recombinantes de hámster, oveja y ciervo. Sin embargo, la eliminación de esta GPI con PI-PLC o expresión de una PrP mutada sin GPI, impedía la formación de PrP^{res} en las mismas condiciones, mientras que una PrP mutada no glicosilada expresada en el mismo sistema conservaba la capacidad de propagación ((Imamura, Kato et al. 2011), (Faburay, Tark et al. 2014)). Por último, cabe mencionar la observación de esta posible barrera entre PrP recombinante y de

encéfalo en PMCA en un reciente estudio publicado por Yuan y colaboradores, en que una PrP recombinante humana expresada en *E.coli* parece inhibir una PMCA basada en encéfalo de ratón transgénico que expresa la misma PrP humana. Sugiriendo que probablemente, a pesar de que la PrP recombinante puede unirse a la PrP^{Sc} preferentemente, su conversión se vea impedida o dificultada por la ausencia de GPI y glicosilaciones (Yuan, Zhan et al. 2013). Aunque también puede encontrarse algún estudio en que se consigue la propagación por rec-PMCA de algún prion en una sola ronda, las condiciones de PMCA son ligeramente diferentes en cuanto a mayor presencia de detergentes en el sustrato, hecho que podría facilitar su malplegamiento (Atarashi, Moore et al. 2007). Tampoco en otros sistemas de propagación *in vitro* utilizados para la generación de PrP^{res} recombinantes, como en el caso del ensayo libre de células, parece haberse observado este fenómeno (Legname, Baskakov et al. 2004), (Colby, Giles et al. 2009)). De forma que la eficiencia de conversión de PrP recombinante bacteriano al añadir semillas consistentes en priones provenientes de encéfalo es muy similar a la que muestran PrP^C purificada de encéfalos o expresada en sistemas celulares eucariotas ((Raymond, Bossers et al. 2000), (Kirby, Birkett et al. 2003)). De todas formas, esta diferencia también podría achacarse a las diferencias entre ambos sistemas como pueden ser la presencia de agentes caotrópicos en el ensayo libre de células o la sonicación en PMCA. Por tanto, todo parece apuntar a que a pesar de que puede conseguirse el malplegamiento de PrP recombinante con inóculos provenientes de encéfalo *in vitro* en una sola ronda, en condiciones más restrictivas la conversión parece estar dificultada por las diferencias entre la PrP recombinante y la proveniente de encéfalo.

Esta barrera entre PrP recombinante y de encéfalo también puede intuirse en el sentido inverso, es decir, cuando se utilizan priones recombinantes para inoculaciones *in vivo*. A diferencia de lo que ocurre con los inóculos obtenidos por PMCA basada en homogenizados de encéfalo, donde habitualmente se da una ligera prolongación del tiempo de incubación pero se mantiene una tasa de ataque similar en un primer pase ((Castilla, Saa et al. 2005), (Castilla, Morales et al. 2008)), los inóculos recombinantes infecciosos suelen presentar tiempos de incubación mucho más prolongados y una tasa de ataque muy baja en un primer pase que aumenta espectacularmente en pases sucesivos ((Makarava, Kovacs et al. 2010), (Wang, Wang et al. 2010)). Cabe mencionar que se han sugerido muchas posibilidades para explicar estos fenómenos, ya que los priones recombinantes fueron generados espontáneamente y además con sustratos de composición mínima. Entre otros, se ha adjudicado esta baja infectividad a que las cepas generadas *de novo* pudieran ser intrínsecamente lentas (Makarava, Kovacs et al. 2010), o a la generación de una mezcla de cepas de las que sólo una mínima fracción es infecciosa y que los diferentes cofactores del sustrato pudieran favorecer unas u otras (Wang, Wang et

al. 2010). El hecho de que los cofactores del sustrato mínimo pudiesen influir en la capacidad de infección, no por selección de cepas sino por ser necesario para la infectividad *in vivo*, quedaría descartado a la luz de una investigación realizada por Deleault y colaboradores. Priones de hámster formados por PMCA con PrP^C purificada y sustrato de composición mínima, muestran una tasa de ataque igual a la obtenida con priones obtenidos de encéfalo, demostrando que los cofactores del medio mínimo no tienen tanta influencia en la infectividad como la propia PrP (Deleault, Harris et al. 2007). Un estudio particularmente interesante publicado este mismo año, mediante comparación de dos cepas de PrP^{res} recombinante con el mismo origen pero infectividad muy diferente, pretende aclarar los factores que determinan estas distintas capacidades de propagación *in vivo*. Una de las PrP^{res}, generada en presencia de cofactor PE (*phosphatidylethanolamine*) y que presenta mayor infectividad, fue el origen de la segunda cepa, la de baja infectividad, obtenida mediante pases seriados de la primera en sustrato con la misma PrP recombinante pero sin PE. Ambas presentan ligeras diferencias estructurales en regiones muy concretas (residuos ~91-115 y 144-163), donde probablemente se da la unión con el cofactor PE en el caso de la de mayor infectividad y también difieren en su capacidad de propagar el malplegamiento en PMCA con sustrato basado en homogenizado de encéfalo. Así, la PrP^{res} de alta infectividad es la única que puede malplegar PrP^C, tanto glicosilada como sin glicosilar. Por tanto, sugieren que las modificaciones postraduccionales que presenta la PrP^C limitan el número de conformaciones que puede adoptar una determinada PrP, mientras que las PrP recombinantes no padecerían esta restricción y podrían adquirir muy diversas conformaciones en PMCA. Entre todas estas conformaciones, solo aquellas con estructuras compatibles con las estructuras de PrP^{Sc} restringidas por la presencia de glicosilaciones y GPI serían capaces de propagar su malplegamiento a PrP^C (Noble, Wang et al. 2015). Si se plantea la situación inversa, la conversión de la PrP recombinante del sustrato a una conformación compatible con la PrP^{Sc} con glicosilaciones y GPI estaría desfavorecida por la gran cantidad de conformaciones que podría adquirir la PrP recombinante, dificultando la aparición y selección de una conformación compatible.

Fruto de la sospecha de que a la barrera de transmisión interespecies se le estuviera sumando la barrera entre PrP recombinante y de encéfalo, se decidió eliminar al menos la barrera interespecies utilizando inóculos previamente obtenidos por PMCA en encéfalos de conejos afectados, tal y como se ve en el apartado 1 de Resultados. Así se pretendían obtener diversas cepas en PrP recombinante de conejo para los que el único impedimento serían las diferencias entre PrP recombinante y de encéfalo. El hecho de que los inóculos utilizados hayan sido previamente adaptados a PMCA mediante pases seriados en homogenizados de encéfalos de conejo supone una ventaja adicional, al tratarse de PrP^{res}

habituada al entorno y sistema de propagación *in vitro*. Además, las características demostradas de la PMCA basada en homogenizados de encéfalo para replicar la infectividad de los priones obtenidos *in vivo* de los que proceden (Castilla, Saa et al. 2005) y la conservación de propiedades específicas de cepa (Castilla, Morales et al. 2008), como también demuestran los estudios con EEB pasado a conejo (Vidal, Fernandez-Borges et al. 2015), sugieren que utilizar estas cepas adaptadas para la conversión de PrP recombinante de conejo no suponga demasiada diferencia respecto a utilizar los inóculos originales. Sin embargo, ni siquiera la eliminación de la barrera interespecies y el uso de inóculos adaptados previamente a PMCA parece haber sido suficiente para superar la elevada resistencia al malplegamiento que presenta la PrP recombinante de conejo. Probablemente por las mismas diferencias entre PrP recombinante y de encéfalo, que parecen ser más limitantes en el caso del conejo que para las otras especies para las que se han obtenido priones recombinantes previamente. Por ello, se decidió utilizar las PrP^{res} recombinantes de ratón, como especie más cercana al conejo de la que se disponían PrP^{res} recombinantes en el laboratorio, ambas obtenidas a partir del prion murino RML mediante rondas seriadas de rec-PMCA pero con un patrón bioquímico distinguible por *Western Blot* que se manifiesta en tamaños ligeramente diferentes de la PrP^{res} (ref. tesis SER). Tampoco así pudo obtenerse una PrP^{res} recombinante de conejo, aparentemente no pudo superarse la barrera de transmisión interespecies que en PMCA basada en homogenizados de encéfalo sí pudo hacerse en 3 rondas seriadas de PMCA (Fernandez-Borges, de Castro et al. 2009). Este hecho no es tan sorprendente si se tiene en cuenta que la PMCA predice semi-cuantitativamente las barreras de transmisión, de forma que en PMCA basada en homogenizados de encéfalo, el RML proveniente de ratones afectados requiere de una sola ronda de PMCA, mientras para malplegar PrP^C de conejo necesita 3 rondas seriadas, reflejando la existencia de barrera de transmisión entre ambas especies. Si se traslada todo esto a la más desfavorecida rec-PMCA, el RML de encéfalo requirió más de 10 rondas seriadas para malplegar la PrP recombinante de ratón (resultados no publicados), por lo que no es de extrañar que una PrP intrínsecamente más resistente al malplegamiento como la PrP recombinante de conejo (Fernandez-Funez, Zhang et al. 2010), pueda requerir más de 20 rondas seriadas incluso en ausencia de barrera interespecies. Pero si además tenemos en cuenta la diferencia de 3 rondas de PMCA requeridas para saltar la barrera de transmisión entre ratón y conejo en PMCA basada en homogenizados de encéfalo, es perfectamente posible que para saltar la barrera de transmisión entre estas mismas PrP recombinantes se requieran también más de 20 pases. Fenómeno que podría explicarse por la menor eficiencia de conversión a PrP^{res} transmisible que presentan las PrP recombinantes debido a la ausencia de modificaciones postraduccionales que puedan restringir las posibles conformaciones realmente transmisibles (Noble, Wang et al. 2015).

Como la imposibilidad de malplegar la PrP de conejo queda descartada a la vista de los resultados obtenidos por Chianini y colaboradores (Chianini, Fernandez-Borges et al. 2012) y dado que no hubo problemas para obtener, mediante la estrategia de adición de semilla y pases seriados de rec-PMCA, priones recombinantes de ratón, siendo especies cercanas en términos de secuencia primaria de PrP, se decidió generar una serie de PrP recombinantes de conejo con sustituciones específicas de ratón. Posteriormente se trató de malplegar estas *in vitro*, tanto para obtener priones recombinantes de conejo, como para estudiar las regiones que determinan su resistencia al malplegamiento *in vitro*. Esta misma estrategia ha sido previamente utilizada para estudios de barreras de transmisión y para la determinación de residuos aminoacídicos claves en la susceptibilidad o resistencia de una determinada especie o variante de PrP, mediante diversos modelos de propagación *in vitro* ((Kocisko, Priola et al. 1995), (Bossers, Belt et al. 1997), (Yan, Huang et al. 2014), (Faburay, Tark et al. 2014)) o *ex vivo* ((Priola and Chesebro 1995), (Priola, Chabry et al. 2001), (Vorberg, Groschup et al. 2003)). Concretamente, la PMCA seriada basada en homogenizados de encéfalo ha demostrado sobradamente su utilidad para el estudio de barreras de transmisión interespecies y su correlación con lo que sucede *in vivo* ((Castilla, Gonzalez-Romero et al. 2008), (Fernandez-Borges, de Castro et al. 2009), (Saa, Sferrazza et al. 2012)). Aunque la gran eficiencia que presenta para superar barreras de transmisión y generar nuevos priones también puede suponer una desventaja, puesto que en algún caso se han superado mediante PMCA barreras que nunca se habían cruzado *in vivo*, ni siquiera en animales transgénicos con sobreexpresión de PrP (Sigurdson, Manco et al. 2006). Pero estos problemas, se han solucionado al menos parcialmente, estableciendo parámetros controlados empíricamente respecto a un estándar en lo que se refiere a número de sonicaciones en cada ronda de PMCA y número de rondas seriadas, evitando así la probable conversión de cualquier PrP de mamífero en PMCA siempre que se utilicen las semillas adecuadas y suficientes rondas (Fernandez-Borges, de Castro et al. 2009). Para los métodos *in vitro* basados en proteínas recombinantes, en los que la conservación de las propiedades de cepa no es clara (Saa, Sferrazza et al. 2012) y tal y como se ha comentado previamente, parecen producirse tanto PrP^{res} infecciosas como no, ya van apareciendo estudios en los que se trata de validarlos y correlacionarlos con lo que sucede *in vivo*. Así, para diversos sistemas de malplegamiento *in vitro* como ensayo libre de células y similares, se ha ido viendo correlación entre los datos *in vivo* e *in vitro* ((Raymond, Bossers et al. 2000), (Panza, Luers et al. 2010), (Kyle, John et al. 2013), (Luers, Bannach et al. 2013)). La ventaja que la rec-PMCA puede suponer respecto a estos otros métodos es la posibilidad de generar priones recombinantes que conserven características de infectividad y de cepa similares a los inóculos de origen, tal y como sucede con la PMCA basada en homogenizados de encéfalo. Mientras que otras técnicas de

propagación *in vitro* se centran principalmente en la observación de si un determinado inóculo puede o no malplegar determinadas PrP recombinantes, sin importar si las fibras resultantes son realmente infecciosas o incluso amiloideas (Ryou and Mays 2008). No obstante, para la rec-PMCA basada en PrP recombinante de origen bacteriano, aún no se encuentran publicaciones que utilicen esta técnica para evaluar barreras de transmisión o que puedan correlacionar los datos obtenidos de susceptibilidad *in vitro* con *in vivo*. Aunque resultados obtenidos recientemente en nuestro laboratorio parecen señalar a que además de poder obtenerse distintas cepas en PrP recombinante de ratón, de humano (ref. tesis SER), de oveja o de ciervo mula (ref. tesis CHF), el sistema de generación de mutantes y testado de su capacidad para propagar PrP^{res} recombinantes provenientes de diversas cepas, sí que tiene cierta correlación con lo que sucede *in vivo*. Particularmente, el método ha sido utilizado con éxito para evaluar la susceptibilidad o resistencia de diversas variantes polimórficas de la PrP ovina frente a priones recombinantes derivados de scrapie y EEB adaptados a oveja, correlacionándose su mayor resistencia al malplegamiento *in vitro* con una mayor resistencia a la infección *in vivo* (ref. tesis CHF). También se ha utilizado este mismo sistema para estudiar la barrera de transmisión entre priones de scrapie ovino y la PrP de cérvido, que presenta sólo 4 diferencias aminoacídicas respecto a la PrP ovina, generándose PrP recombinantes de oveja con mutaciones puntuales de ciervo y midiendo su capacidad de propagación por scrapie *in vitro*. Así se localizaron residuos específicos que podrían ser determinantes en la barrera de transmisión y que concuerdan con regiones críticas propuestas mediante la utilización de otras aproximaciones (ref. tesis Chf).

Por tanto, tal y como se detalla en el apartado 2 de Resultados, se generaron 11 PrP recombinantes de conejo mutadas con sustituciones específicas de la PrP de ratón, abarcando todas las diferencias de la región central entre ambas PrP recombinantes, con la intención de localizar los residuos críticos para la resistencia al malplegamiento presentada por la PrP recombinante de conejo wt. Sorprendentemente, en el caso de 8 de los 11 mutantes, la sustitución única que llevan respecto a la PrP de conejo salvaje fue suficiente para permitir su conversión por el prion recombinante de ratón derivado de RML. La necesidad de más de una ronda de rec-PMCA para su generación indica que ninguna de ellas por sí sola es responsable de la barrera interespecies, aunque todos y cada uno de los 8 cambios reducen en cierto grado la barrera presente entre ratón y conejo. En principio, podría establecerse una semi-cuantificación del grado de reducción de la barrera de transmisión en función de las rondas necesarias para la obtención de cada PrP^{res}, de forma que las que se malpliegan en un menor número de rondas serían aquellas que mayor influencia tienen sobre la resistencia de la PrP de conejo (Fernandez-Borges, de Castro et al. 2009). Sin embargo, la estocasticidad propia de la PMCA y la

ausencia de réplicas interexperimentales lo desaconsejan y se prefirió utilizar pruebas complementarias que pudieran señalar las sustituciones más críticas para la susceptibilización de la PrP de conejo frente a priones murinos. Es por ello por lo que se decidió añadir la barrera extensamente mencionada anteriormente entre las PrP recombinantes y de encéfalo, a la dificultad de malplegamiento debida a las diferencias aminoacídicas. Como se muestra en el apartado 3.2. de Resultados, únicamente 3 de los 8 mutantes susceptibles pudieron malplegar con RML procedente de encéfalo (BrainRML) y además de forma consistente con lo esperado, pues se generan en todos los casos en rondas de PMCA más tardías que las malplegadas con RML recombinante (recRML). Sin embargo, no puede establecerse una correlación directa entre el número de rondas necesario para la aparición de PrP^{res} inducida por recRML con la aparición de PrP^{res} inducida por BrainRML. Tal y como demuestran los mutantes G99N, L137M y Q219K, que a pesar de ser malplegados por recRML en rondas igual de tempranas que el S107N, el M108L o el I202V, no pudieron ser malplegados mediante adición de BrainRML, probando que el número de ronda en que aparece PrP^{res} no es un método totalmente fiable para establecer una jerarquía entre las mutaciones.

Otro criterio más utilizado para identificar posiciones críticas en la barrera de transmisión en estudio, o más bien confirmar su importancia, es la que se presenta en el apartado 7 de Resultados. Mediante la generación de PrP recombinantes de ratón con los mismos 11 residuos sustituidos por los que presenta la PrP de conejo, se pretendía averiguar si alguna de las sustituciones que causan una mayor susceptibilidad al malplegamiento de la PrP recombinante de conejo podría en el contexto de ratón, aumentar la resistencia de la PrP recombinante murina al malplegamiento por RML. En este caso, uno sólo de los mutantes fue incapaz de malplegar en una sola ronda de PMCA, el N99G, que pudo malplegarse en 4 rondas seriadas. El resto también mostraron cierta barrera aunque mucho menor, ya que la capacidad de propagación se ve reducida entre 2 y 5 logaritmos de dilución máxima de inóculo. Entre las que más parecen reducir la propagación están las PrP recombinantes que contienen las mutaciones N173S, V202I y K219 y las que menor barrera parecen suponer son el M137L, I183V y V214I.

La correlación entre las sustituciones críticas en el contexto de la PrP de conejo y en el contexto de la PrP de ratón no es perfecta, tal y como se esperaba, puesto que es bien sabido que la barrera de transmisión no está condicionada únicamente por las diferencias en la secuencia aminoacídica si no que parece regirse más bien por propiedades conformacionales de la PrP^{res} y la PrP nativa, a las cuales las diferencias aminoacídicas puntuales afectan de distinta forma en función del entorno (Hagiwara, Hara et al. 2013). No obstante, llama la atención el hecho de que el efecto más débil o más pronunciado sobre la

barrera de transmisión se conserva en el caso de las mutaciones en las posiciones 202, 183 y 214, señalando la primera como crítica en la determinación de la barrera de transmisión interespecies mientras que las dos últimas parecen ser irrelevantes. Por el contrario, la mayor incongruencia entre el efecto de una misma sustitución sobre la PrP recombinante de conejo y la PrP recombinante de ratón se da en la posición 173, que aunque parezca irrelevante en el contexto de la PrP de conejo, sí que muestra cierto efecto de barrera en el contexto de la PrP de ratón.

A pesar de que no se encuentran muchos estudios en torno a los determinantes de la barrera interespecies entre conejo y ratón, ni estudios de transmisibilidad exitosos en conejo salvo las publicaciones recientes mencionadas ((Chianini, Fernandez-Borges et al. 2012), (Vidal, Fernandez-Borges et al. 2015)), se tratará de analizar si las posiciones detectadas por nuestro sistema *in vitro* que influyen en la barrera, han sido señaladas por otros como claves en la resistencia o susceptibilidad al malplegamiento en distintos modelos o especies.

Uno de los mejores puntos de partida para ello, es el único otro estudio encontrado en la literatura científica en que se tratan de discernir los aminoácidos clave que determinan la barrera interespecies entre ratón y conejo, realizado por Vorberg y colaboradores (Vorberg, Groschup et al. 2003). En primer lugar cabe destacar que realizaron el estudio en una línea celular de neuroblastoma de ratón persistentemente infectada con RML, denominada Sc⁺-MNB (del inglés, *scrapie positive mouse neuroblastoma*), en la que expresan PrP de conejo, quimeras de PrP de conejo y ratón o PrP mutadas de ratón con determinadas sustituciones de conejo y observan la formación o no de PrP^{res}. Igual que en nuestro caso, no pudieron inducir el malplegamiento de la PrP de conejo expresada en las Sc⁺-MNB directamente, por lo que testaron diferentes quimeras de ambas PrPs para determinar las regiones responsables de esta resistencia al malplegamiento. Todas las quimeras llevan el epítipo del anticuerpo monoclonal L42 que se introduce en la PrP de ratón mediante la sustitución W144Y, para distinguir las PrP^{res} generadas del RML con el que las células están persistentemente infectadas. La introducción de esta mutación apenas perturba la capacidad del RML de malplegar la PrP de ratón, posición aminoacídica que nuestros experimentos tampoco han revelado como crítica en la barrera. Las quimeras construidas y expresadas en esta misma línea celular incluían una PrP con la región central de ratón (aminoácidos del 111 al 177) y extremos de conejo, que no pudo malplegar en absoluto, una PrP con el extremo amino terminal (aminoácidos de 1 a 111) de conejo, que tampoco pudo ser malplegada y una PrP con el extremo carboxilo terminal (aminoácidos de 177 a 254) de conejo, que redujo drásticamente pero no abolió completamente la formación de PrP^{res}, indicando que diferencias aminoacídicas de

cualquier región de la PrP influyen en la barrera, con aparentemente una mayor relevancia de las mutaciones en las regiones central y N-terminal. También esto concuerda a grandes rasgos con nuestros hallazgos, ya que hemos detectado sustituciones que afectan a la barrera en todas las regiones de la PrP recombinante de conejo.

Después de estudiar regiones enteras, se decidieron por estudiar aminoácidos concretos que podrían prevenir la formación de PrP^{res} a partir de la PrP de conejo. Igual que en nuestro caso, descartan las sustituciones en los residuos que van desde el 1 hasta el 94, puesto que diversos estudios *in vitro* e *in vivo* ya han demostrado que esa región de la proteína no es crítica para la formación de PrP^{res} ((Rogers, Yehiely et al. 1993), (Fischer, Rulicke et al. 1996), (Lawson, Priola et al. 2001)), de forma que en el extremo amino terminal de la proteína deciden realizar sustituciones en las mismas posiciones que nosotros, 99, 107 y 108. Generaron 3 PrPs de ratón con el epítipo del L42 y con cada una de las sustituciones mencionadas, N99G, N107S y L108M, de las que únicamente el N99G y L108M impiden la formación de PrP^{res}. No obstante, mediante la generación del doble mutante N107S L108M, el efecto inhibitorio para la formación de PrP^{res} causado por la sustitución L108M desaparece, demostrando que el efecto negativo de una sustitución aminoacídica puede ser compensado por la introducción de una sustitución adicional. Este fenómeno, apunta nuevamente a que es la estructura tridimensional en general y no necesariamente la similitud de secuencias primarias, la que determina las barreras de transmisión. En nuestro caso, los resultados obtenidos con las sustituciones en PrP recombinante de ratón coinciden en el caso del N99G y el N107S, pero no en el caso del L108M y concuerdan menos aún con los resultados obtenidos en PrP recombinantes de conejo con sustituciones de ratón, en las que las posiciones 107 y 108 parecen de las más relevantes. Así mismo, en nuestro caso, la generación de una PrP con ambas sustituciones 107 y 108, no modifica significativamente el efecto de cada mutación individualmente aunque la diferencia bien podría deberse al contexto aminoacídico, que en su caso es de ratón, mientras en el nuestro es PrP de conejo. También las diferencias existentes entre ambas técnicas podrían justificar las diferencias observadas, probablemente por motivos sobradamente discutidos como las glicosilaciones o el anclaje a membrana mediante GPI. Esta región amino terminal, aparentemente flexible y desestructurada, podría estar implicada en interacciones intra o intermoleculares con el núcleo central de la proteína, la superficie celular o con ligandos naturales (Billeter, Riek et al. 1997), como se discutirá más adelante y también se ha demostrado su importancia en la formación de PrP^{res} ((Rogers, Yehiely et al. 1993), (Holscher, Delius et al. 1998), (Lawson, Priola et al. 2001), (Yan, Huang et al. 2014)) y la transmisión interespecies ((Fischer, Rulicke et al. 1996), (Supattapone, Muramoto et al. 2001)). Así mismo, se cree que durante la formación de PrP^{res} el dominio

amino terminal padece un drástico cambio conformacional debido a que cuando adquiere conformación de PrP^{res} queda parcialmente protegido de la digestión por proteasas ((Stahl, Baldwin et al. 1993), (Peretz, Williamson et al. 1997)), por lo que un posible mecanismo por el que estas mutaciones afectan en la formación de PrP^{res}, es que impidan este cambio conformacional mayor. En este sentido, la Serina en posición 107, que presentan casi exclusivamente lepóridos y macacos, es uno de los residuos que más poderosamente llama la atención, puesto que los macacos presentan resistencia a la infección *in vivo* por EDC de cérvidos, mientras que otros primates como los monos ardilla, con secuencias muy similares de PrP son altamente susceptibles al mismo agente ((Race, Meade-White et al. 2009), (Race, Meade-White et al. 2014)), aunque se desconoce la implicación concreta que podría tener dicho residuo aminoacídico. También la posición 108 ha demostrado cierta relevancia en otras especies, con el más claro ejemplo del topillo rojo en que un polimorfismo natural, es decir la presencia de Isoleucina en lugar de Metionina en esa misma posición (topillo rojo 109I o topillo rojo 109M), induce el malplegamiento espontáneo tanto *in vivo* como *in vitro* y desarrollo de una EET esporádica ((Watts, Giles et al. 2012) y datos no mostrados de nuestro laboratorio). Además, esta misma PrP polimórfica ha permitido el desarrollo del modelo de enfermedad priónica *in vivo* con menor tiempo de incubación descrito, mediante transmisión de una cepa de EDC a esta especie (Di Bari, Nonno et al. 2013). También en ratón, los genotipos a y b definidos en función de la susceptibilidad que presentan a scrapie y que se distinguen entre sí en únicamente 2 residuos aminoacídicos implican la posición 108, en que la presencia de Leucina o Fenilalanina influye en la transmisión y los tiempos de incubación de las EETs (Moore, Hope et al. 1998). En diversas ocasiones se ha propuesto para el extremo amino terminal de la PrP una función relacionada con su capacidad para coordinar iones de cobre, por lo que cambios en esta zona que podrían tener su relevancia para la realización de esta función y probablemente también con su capacidad de agregación ((Badrick and Jones 2009), (Rivillas-Acevedo, Grande-Aztatzi et al. 2011)). Otra posible explicación de la relevancia de esta región amino terminal para la transmisión interespecies, podría derivarse de lo poco que se conoce del mecanismo de conversión de PrP^C a PrP^{Sc}. Como ya se ha comentado extensamente en la Introducción, la conversión de PrP^C a PrP^{Sc} comprende probablemente dos etapas secuenciales, con una primera fase en que se da la interacción entre ambas y con una segunda en la que tiene lugar la reordenación estructural hacia una mayoría de hoja- β (Hara, Okemoto-Nakamura et al. 2012). Un estudio realizado por Enari y colaboradores con intención de ahondar en el mecanismo de conversión mostró que el anticuerpo monoclonal 6H4, dirigido contra la hélice- α 1, tiene la capacidad de prevenir la infección con scrapie en la línea celular N2a, sugiriendo que la primera hélice- α es clave para la interacción de ambas isoformas (Enari, Flechsig et al. 2001). Otro

estudio similar basado en anticuerpos monoclonales que mapean regiones concretas de la PrP^C de ratón establece también dos zonas de interacción entre PrP^C y PrP^{Sc}, por un lado la región entre los residuos 89 y 112 y por otro lado, del 136 al 158 (Moroncini, Kanu et al. 2004).

En cuanto a la región central de la PrP, Vorberg y colaboradores realizaron sustituciones en los residuos 137, 144, que ya se ha comentado es el que determina el epítipo para el anticuerpo L42 y no tiene un papel importante en la capacidad de malplegamiento de la PrP de ratón, y 173 (Vorberg, Groschup et al. 2003). En esta región, únicamente bloquea la propagación la PrP de ratón con la sustitución N173S, mientras que las otras dos sustituciones no muestran prácticamente ningún efecto en la formación de PrP^{res}. Estos resultados, señalan las posiciones 137 y 144 como irrelevantes, a pesar de que su posición en uno de los sitios de interacción PrP^C-PrP^{Sc} señalados por Moroncini y colaboradores hace pensar que, aunque no vital, el efecto visto en nuestros estudios podría relacionarse con este sitio de interacción, que también ha sido identificado y relacionado con la susceptibilidad asociada a determinados polimorfismos de la PrP ovina ((Goldmann, Martin et al. 1996), (Vaccari, D'Agostino et al. 2007), (Rigter, Langeveld et al. 2007), (Papasavva-Stylianou, Kleanthous et al. 2007)). En cuanto a la posición 173, los resultados son totalmente opuestos a nuestros hallazgos, que descartan que las sustituciones 173 y 183 tengan relevancia alguna para la barrera de transmisión. No obstante, igual que en el estudio de Vorberg y colaboradores, la posición 173 y los residuos adyacentes, localizados en el giro entre la hoja-β 2 y la hélice-α 2 conocido como lazo rígido, han sido implicados en la determinación de la barrera de transmisión entre diversas especies. Entre otros, está implicado en la barrera de transmisión entre visón (*Neovison vison*) y hurón (*Mustela putorius*) (Bartz, McKenzie et al. 1994), en la barrera de transmisión de scrapie entre diferentes razas de ovinas y murinas ((Westaway, Goodman et al. 1987), (Westaway, Zuliani et al. 1994), (Moore, Hope et al. 1998)), así como en la formación de PrP^{res} *in vitro* ((Bossers, Belt et al. 1997), (Bossers, de Vries et al. 2000)) y también en la barrera que muestran diversas especies a la infección con EDC de cérvidos ((Kurt, Telling et al. 2009), (Sigurdson, Nilsson et al. 2010), (Kyle, John et al. 2013), (Kurt, Jiang et al. 2014)). De hecho, la rigidez del lazo β2-α2 es una de las características más significativas de la PrP de cérvidos (Gossert, Bonjour et al. 2005) y se considera clave en su transmisibilidad interespecies (Billeter, Riek et al. 1997). Cuando en 1996 se describió la primera estructura de la PrP^C murina, no se detectaron resonancias en la zona del lazo β2-α2, sugiriendo que esta región de la proteína es altamente heterogénea en cuanto a su conformación (Riek, Hornemann et al. 1996), aunque la posterior obtención de la estructura cristalina de la PrP^C de conejo mediante rayos X mostró una estructura bien definida de esta región, llegando a describirse la interacción de la Prolina 165 y la Valina 166 con la Glutamina 168 y la Tirosina 169

mediante un puente de hidrógeno (Khan, Sweeting et al. 2010). Mediante la resolución de la estructura de otras PrPs por RMN se sugirió que cambios aminoacídicos en dicho lazo mantienen la estructura global de la proteína pero alteran los enlaces de hidrógeno mencionados antes, pudiendo influir en las interacciones proteína-proteína necesarias para la conversión de PrP^C a PrP^{Sc} (Billeter, Riek et al. 1997). Concretamente, mediante estudios de simulación de dinámica molecular se ha determinado que el residuo 169 (en muchos casos numerado como 170 por basarse en otras secuencias primarias de PrP murina) en la PrP^C de ratón es el principal determinante de la movilidad del lazo y que la introducción de mutaciones propias del lazo rígido bloquean la movilidad de esta región presumiblemente por la ruptura de los puentes de hidrógeno ((Gorfe and Caflisch 2007), (Kyle, John et al. 2013)). Así, se ha demostrado por ejemplo en ratones transgénicos cuya secuencia de PrP fue modificada introduciendo las sustituciones S169N y N173T, que conforman el lazo rígido $\beta 2-\alpha 2$, que su susceptibilidad a priones murinos se reduce drásticamente, con tiempos de incubación muy superiores a los presentados por los ratones wt, mientras aumenta su susceptibilidad a EDC de cérvidos ((Kyle, John et al. 2013), (Sigurdson, Nilsson et al. 2010)). Fenómeno que también se ha reproducido en modelos celulares murinos (Kurt, Jiang et al. 2014). Un estudio muy similar llevado a cabo en ratones transgénicos que expresan PrP humana modificada con lazo rígido también demostró la importancia de esta zona en la barrera entre humanos y cérvidos, ya que se incrementa su resistencia a ECJ mientras que se reduce en el mismo grado para la EDC de cérvidos (Kurt, Jiang et al. 2015). Sin embargo, resultados recientemente obtenidos en el laboratorio mediante rec-PMCA aplicada al estudio de la barrera entre ovinos y cérvidos, aunque concuerdan a grandes rasgos con los estudios previos en cuanto al aumento de la resistencia frente a cepas de scrapie y EEB, también dieron lugar a resultados inesperados al añadir la cepa de EDC como semilla. La PrP recombinante ovina modificada para contener el lazo rígido (S173N N177T) fue incapaz de propagar el malplegamiento de la cepa EDC a pesar de la identidad casi completa de la estructura del lazo $\beta 2-\alpha 2$. No obstante, la adición a esta PrP mutada de un único cambio aminoacídico que aumentaba aún más la similitud entre las secuencias primarias de la PrP ovina y de ciervo, la mutación I208M, alteró completamente los resultados. La introducción de la mutación del extremo carboxilo terminal, concretamente en la hélice- α 3, no sólo incremento la capacidad de propagación de la EDC, sino también la de los inóculos de scrapie y EEB. Lo cual indica que para una propagación eficiente de la EDC se requiere además de un lazo rígido, un entorno aminoacídico adecuado en el extremo carboxilo terminal o más concretamente alrededor de la posición 208. De hecho, el hecho de que estos resultados no se vieran alterados por la eliminación de la mutación S173N, refuerza la hipótesis de que el entorno aminoacídico en el extremo carboxilo terminal es un importante modulador de la barrera ejercida por

diferencias en el lazo rígido (ref. tesis CHF). Coincidiendo con estos resultados, varios estudios basados en RMN parecen también indicar que la alta resistencia frente a las enfermedades que presenta especies de lepóridos o equinos, podría estar determinada por la presencia del lazo rígido y su interacción con la zona carboxilo terminal, más concretamente la hélice- α 3 ((Perez, Damberger et al. 2010), (Wen, Li et al. 2010)). Por tanto, la poca relevancia de la mutación en la posición 173 en las PrPs de conejo y ratón que reflejan nuestros resultados, además de por las diferencias ya discutidas entre ambas técnicas, podría explicarse por la ausencia de un entorno adecuado en la hélice- α 3 o también podría ser que a diferencia de lo que ocurre con la barrera entre cérvidos y otras especies, el lazo rígido no sea determinante en esta barrera a pesar de tener cierto efecto. De todas maneras, tras discutir la influencia del resto de mutaciones puntuales ubicadas en la región carboxilo terminal, se analizarán las diversas publicaciones que mediante análisis estructural de la PrP^C de conejo tratan de localizar regiones posiblemente involucradas en su elevada resistencia al malplegamiento.

Volviendo al estudio realizado por Vorberg y colaboradores, sólo estudian el efecto de una única mutación en el dominio carboxilo terminal basándose en un estudio previo en que se mostraba cierta importancia del codón 214 en la conversión a PrP^{res} de PrP quiméricas de humano y ratón en cultivos celulares murinos persistentemente infectados con priones murinos (Kaneko, Zulianello et al. 1997). Al expresar la PrP de ratón con la sustitución V214I en la línea celular Sc⁺-MNB, la formación de PrP^{res} se reduce drásticamente, probando la influencia de esta posición en la barrera entre ambas especies (Vorberg, Groschup et al. 2003). Los autores alegan que tanto el codón 173 como el 214 son parte de una misma región superficial formada por el lazo β 2- α 2 y parte del extremo carboxilo terminal, que podría funcionar como zona de interacción inicial entre PrP^C y PrP^{Sc} (residuos 164 a 173 y de 205 a 222) (Horiuchi and Caughey 1999). Aunque se cree que las sustituciones S173N y V214I no alteran la estructura global de la zona de interacción, sí que podrían modificar su especificidad mediante alteración de interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno con otras proteínas (Billeter, Riek et al. 1997). Además, residuos aminoacídicos en esta misma región superficial (residuos 167, 171, 214 y 218) han sido propuestos como zona de unión del siempre controvertido factor X que a opinión de algunos podría estar implicado en la conversión (Kaneko, Zulianello et al. 1997), aunque experimentos en ensayo libre de células han demostrado que PrPs heterólogas se unen a la PrP^{res} en esta región, bloqueando la formación de PrP^{res} (Horiuchi and Caughey 1999). Así pues, defienden que cambios en el residuo 214 afectan a la formación de PrP^{res} mediante competición directa con otras PrPs por un lugar de interacción común en la PrP^{res} (Vorberg, Groschup et al. 2003). Una vez más, estos resultados difieren de los obtenidos mediante rec-PMCA, en que la sustitución en la posición 214 no afecta la conversión de

la PrP en el contexto de conejo, mientras que la introducción del aminoácido correspondiente a la secuencia de conejo en el contexto de la PrP de ratón, sí que da lugar a una barrera de propagación, aunque con muy poca influencia. En nuestro caso además, se han estudiado los codones 183, 202, 204 y 219, entre los que las alteraciones en el 183 tampoco causan ningún efecto significativo, mientras que el resto afectan a la susceptibilidad siendo la sustitución en el codón 202 la que mayor efecto parece tener. La importancia de la mayoría de estas posiciones que muestran un considerable efecto, concuerda con las propuestas que involucran la región formada por el lazo β 2- α 2 y la hélice- α 3, pues todas y cada una de ellas podrían alterar las interacciones entre proteínas que tendrían lugar en esta región. Otros autores también han apuntado hacia la hélice- α 3 como región crítica para el proceso de oligomerización y formación de fibras según observaciones realizadas por simulaciones de dinámica molecular. Concretamente, utilizando la PrP ovina vieron que el dominio conformado por las hélices- α 2 y 3 (α 2- α 3), bajo determinadas condiciones de pH y temperatura tuvo la capacidad de malplegarse *in vitro* en una estructura de horquillas β que actúa como semilla para el proceso de fibrilización (Chakroun, Prigent et al. 2010). En la misma dirección apunta el estudio realizado por Chen y colaboradores, que mediante un análisis estadístico de acoplamiento de múltiples secuencias de PrP determinaron una red de residuos que son evolutivamente importantes y localizaron una probable región de iniciación del cambio conformacional entre PrP^C y PrP^{Sc}, que implicaría cambios estructurales en las hélices- α 2 y 3 (Chen and Thirumalai 2013). Si se contempla este escenario, todos los cambios del extremo carboxilo terminal ubicados en la hélice- α 3 que parecen interferir con la propagación podrían estar alterando la hélice- α 3 o las interacciones existentes entre ambas hélices, interfiriendo con el inicio de la conversión. Para alguna de estas posiciones, se puede encontrar cierta correlación a lo descrito para las barreras de transmisión en otras especies, como es el caso de la mutación en el codón 204, equivalente a la posición 208 en la PrP ovina previamente mencionada. Además de los estudios presentados, cabe destacar otros que refuerzan la idea de la importancia de alteraciones en la hélice- α 3 y que conectan la relevancia del lazo β 2- α 2 y su interacción con la hélice- α 3 con la relevancia en la iniciación del malplegamiento de las hélices α 2- α 3. El estudio llevado a cabo por Prigent y colaboradores también con PrP ovina demostró la importancia del lazo β 2- α 2 en la formación y diversidad conformacional de los oligómeros y determinó que el aumento de la rigidez del lazo β 2- α 2, debida a la introducción de puentes disulfuro entre el lazo y la hélice- α 3, reducía significativamente la formación de oligómeros *in vitro* mediante tratamiento térmico (Prigent and Rezaei 2011). Ya se ha visto además que numerosos estudios sugieren que el evento que precede al proceso de polimerización consiste en un distanciamiento del dominio α 2- α 3 del resto de la proteína, respaldado por el estudio realizado por

Hafner-Bratkovic y colaboradores en que mediante introducción de puentes disulfuro conectando los dominios $\beta 1-\alpha 1-\beta 2$ y $\alpha 2-\alpha 3$ en la PrP murina en un modelo celular persistentemente infectado observaban un bloqueo de la propagación (Hafner-Bratkovic, Gaedtke et al. 2011). Por último, un estudio de intercambio de hidrógeno-deuterio en monómeros y oligómeros de PrP ovina sintetizados *in vitro* mostraron un elevado nivel de intercambio en la zona del lazo $\beta 2-\alpha 2$, mostrando la elevada exposición a solvente que tiene esta región (Eghiaian, Daubenfeld et al. 2007) y que por tanto, podría actuar como bisagra de los dominios $\beta 1-\alpha 1-\beta 2$ y $\alpha 2-\alpha 3$ (Eghiaian, Daubenfeld et al. 2007), (Prigent and Rezaei 2011)). Así pues, en concordancia con estas ideas, las mutaciones realizadas en el extremo carboxilo terminal que podrían afectar a la estabilidad de la hélice- α 3 o su interacción con la hélice- α 2 y por consiguiente con la capacidad de malplegamiento son en nuestro caso los codones 202, del que se ha descrito como mutación causante de la forma familiar de la ECJ, V203I con la numeración correspondiente a la PrP humana, demostrando su relevancia en el malplegamiento (Peoc'h, Manivet et al. 2000); 204, que ya se ha demostrado muy importante en PrP ovina ((Chakroun, Prigent et al. 2010), (Chakroun, Fornili et al. 2013), ref. tesis CHF) y 219, adyacente al codón 222 en ganado caprino cuyo polimorfismo Q222K concede cierta resistencia a la infección con scrapie *in vivo* (Vaccari, Di Bari et al. 2006) y también observado por rec-PMCA en PrP ovina (ref. tesis Chas), así como al codón 219 en PrP humana, equivalente al 222 ovino, que confiere cierta protección frente a la infección por la ECJ (Biljan, Giachin et al. 2012).

La resolución mediante RMN, cristalografía de rayos X y depósito en el PDB (Protein Data Bank, (Berman, Battistuz et al. 2002)) de las estructuras tridimensionales de las regiones central y carboxilo terminal de la PrP^C de conejo wt (124-228) (Código PDB para estructura resuelta por RMN: 2FJ3; para estructura resuelta por rayos X: 3O79) y de los mutantes S173N (124-228) (Código PDB 2JOH) e I214V (124-228) (Código PDB 2JOM) atrajo rápidamente la atención de diversos grupos de investigación que mediante simulaciones de dinámica molecular han tratado de determinar características únicas de esta PrP que pudieran explicar su elevada resistencia a las EETs. Los estudios realizados por Wen y colaboradores con las estructuras obtenidas por RMN para las PrP de conejo wt, S173N e I214V, muestran ciertas características particulares de la PrP de conejo. En comparación con los mutantes, la PrP de conejo wt muestra un lazo $\beta 2-\alpha 2$ (165-172) bien estructurado y una distribución de cargas superficiales característica con un gran área continua de carga positiva (formada por las regiones 125-135, 150-160 y 180-190). También detectan toda una red de puentes de hidrógeno entre los siguientes residuos: M128-Y162, G130-V160, I138-Y149, R155-N201, R155-D148, H176-E210, H186-R155 y S221-D166 que podrían participar en la elevada estabilidad estructural de dicha PrP. La introducción de la

mutación S173N, causa cambios significativos en estas estructuras características de la PrP^C de conejo wt, como un aumento en la flexibilidad del lazo β 2- α 2 que interfiere en la interacción del lazo con la hélice- α 3, llevando a una reducción de estabilidad conformacional global demostrado por desnaturalización frente a urea. También altera la distribución de cargas superficiales, provocando la aparición de carga negativa alrededor del residuo 173 además de neutralizar las cargas en la zona del residuo 219, de forma que la plausible zona de interacción PrP-PrP o con la hipotética proteína X (regiones 90-144 y 180-205) se ve alterada (Figura XX). Además, altera completamente la red de puentes de hidrógeno observada, reduciendo su número y probablemente afectando también a la estabilidad de la estructura global frente a agentes desnaturalizantes (Wen, Li et al. 2010). La introducción de la mutación I214V, causa igualmente una reducción en el número de puentes de hidrógeno y altera la distribución superficial de cargas, aunque en este caso no altera la carga superficial en la misma zona de la mutación, sino alrededor de los residuos 124 y 164 (Figura 32). Estos cambios observados, se traducen también en una menor estabilidad conformacional global frente a la desnaturalización por urea, de forma que además de la alteración de las interacciones entre el lazo β 2- α 2 y la hélice- α 3, la distribución de cargas superficial y la red de puentes de hidrógeno parecen ser determinantes para la resistencia al malplegamiento de la PrP de conejo wt (Wen, Li et al. 2010).

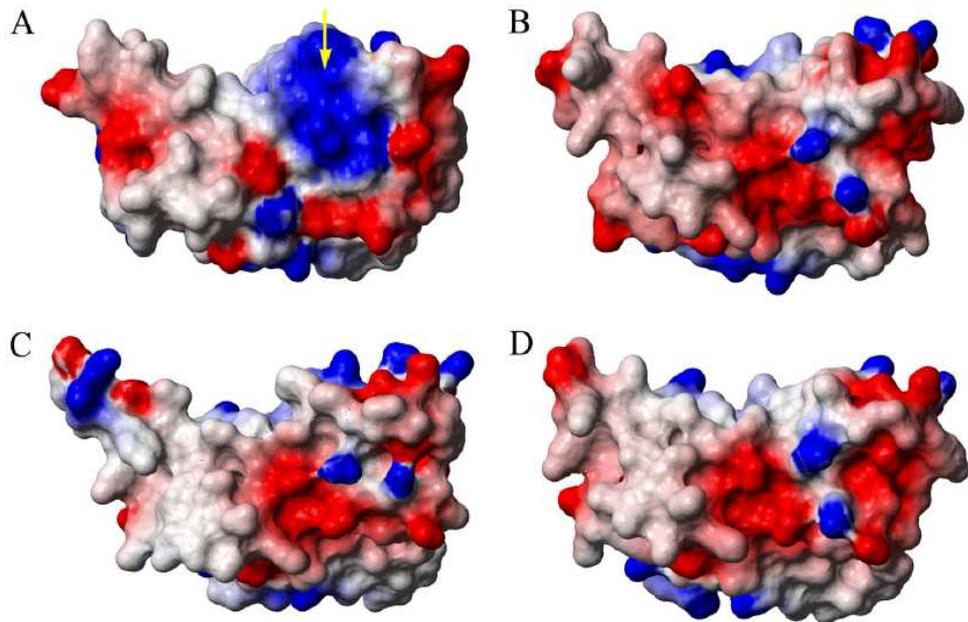


Figura 32. Distribución de las cargas superficiales de A) PrP recombinante de conejo wt (Código PDB 2FJ), B) PrP recombinante humana (Código PDB 1QM3), C) PrP recombinante de ratón (Código PDB 1XYX) y D) PrP recombinante de vaca (Código PDB 1DWZ). Estructuras tridimensionales determinadas en buffer de Acetato de

sodio a pH 4.5. La coloración azul indica carga positiva y la coloración roja, carga negativa. Generadas utilizando MolMol (De (Wen, Li et al. 2010)).

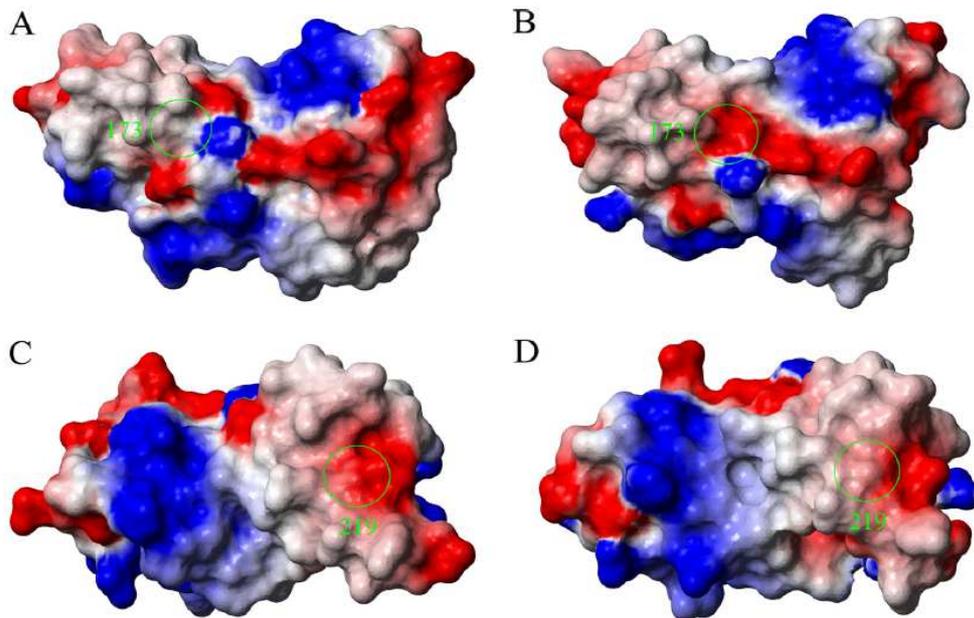


Figura 33. Distribución de las cargas superficiales de PrP recombinante de conejo wt (Código PDB 2FJ-) y PrP recombinante de conejo S173N (Código PDB 2JOH). A) Posición 173 en la PrP recombinante de conejo wt, B) Posición 173 en la PrP de conejo recombinante S173N, C) Posición 219 de la PrP recombinante de conejo wt y D) Posición 219 de la PrP recombinante de conejo S173N. Estructuras tridimensionales determinadas en buffer de Acetato de sodio a pH 4.5. La coloración azul indica carga positiva y la coloración roja, carga negativa. Generadas utilizando MolMol (De (Wen, Li et al. 2010)).

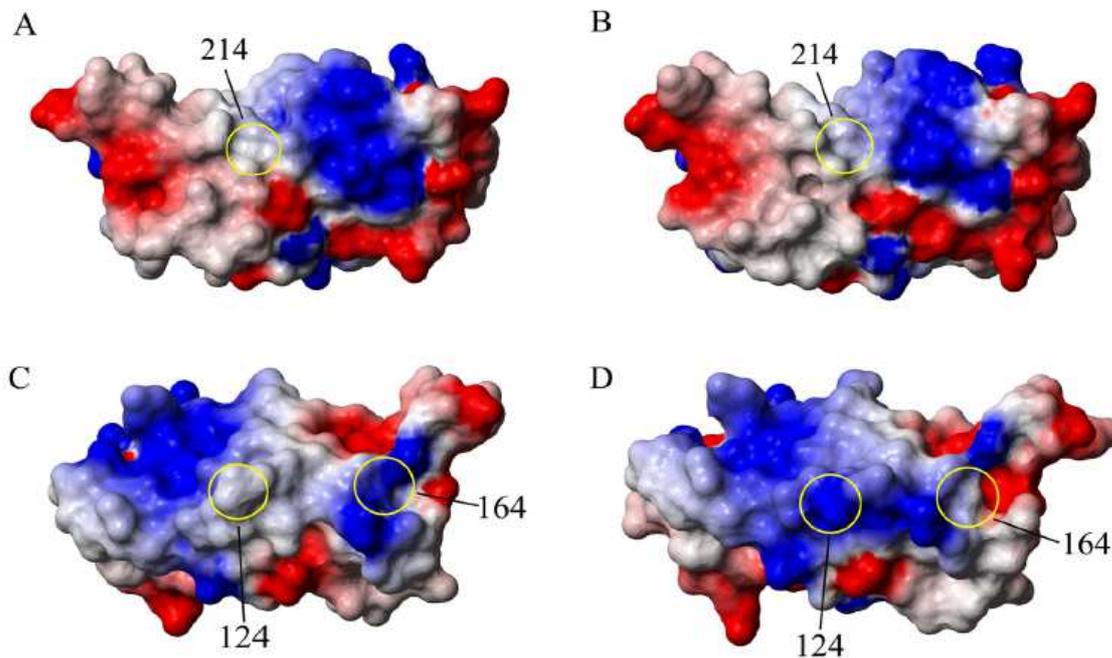


Figura 34. Distribución de las cargas superficiales de PrP recombinante de conejo wt (Código PDB 2FJ-) y PrP recombinante de conejo I214V (Código PDB 2JOM). A) Posición 214 en la PrP recombinante de conejo wt, B) Posición 214 en la PrP de conejo recombinante I214V, C) Posiciones 124 y 164 de la PrP recombinante de conejo wt y D) Posiciones 124 y 164 de la PrP recombinante de conejo I214V. Estructuras tridimensionales determinadas en buffer de Acetato de sodio a pH 4.5. La coloración azul indica carga positiva y la coloración roja, carga negativa. Generadas utilizando MolMol (De (Wen, Li et al. 2010)).

Por otro lado, diversos estudios de simulación de dinámica molecular realizados por Zhang y colaboradores, detectan otras características únicas. Mediante comparación de las PrPs de conejo, ratón y humano encontraron que la mayor estabilidad de la PrP de conejo parecía deberse al efecto estabilizante del puente salino D177-R163, que une el lazo $\beta 2$ - $\alpha 2$ con la hélice- $\alpha 2$, así como a la contribución del puente salino D201-R155, que une las hélices- $\alpha 1$ y 3 y del puente de hidrógeno H186-R155. Además encuentran que el puente disulfuro propio de la PrP que une las hélices- $\alpha 2$ y 3 mantiene la integridad de varios puentes salinos. Mediante la incubación a pH más ácidos, estos puentes salinos desaparecen y aunque dejan la estructura global de las PrPs de ratón y humana prácticamente intactas, provocan el colapso de la estructura tridimensional de la PrP de conejo, demostrando su relevancia en la estabilidad de esta PrP. De entre todas estas características, la única conservada entre las PrPs de conejo, caballo y perro (utilizados todos como modelo de PrP resistentes al malplegamiento) es el puente salino D177-R163 y su ruptura a pH bajo implica un gran cambio estructural en las hélices- $\alpha 1$ y 3 , de forma que lo proponen como la principal razón de la elevada estabilidad conformacional de las

PrPs de conejo, perro y caballo ((Zhang 2009), (Zhang 2011)). En un estudio muy similar a los anteriores, utilizan las PrPs de conejo wt y los mutantes S173N e I214V, donde observan que la introducción de cualquiera de las dos mutaciones altera la red de puentes salinos y de hidrógeno (Zhang and Zhang 2014), contribuyendo a una mayor inestabilidad estructural. Concretamente, ambos mutantes impiden la formación del puente salino D177-R163, respaldando su relevancia en la estabilidad de la PrP de conejo (Zhang 2010). Cabe destacar, que las condiciones de pH utilizadas en cada estudio varían y que esto puede alterar las uniones que se detectan en cada caso, lo que podría explicar las diferencias entre las estructuras detectadas por cada grupo de investigación, aunque a pH neutrales se encuentran muchos elementos coincidentes como la presencia del puente de hidrógeno R155-N201 (Zhang and Zhang 2014). En cualquier caso, todos los estudios apuntan a una gran relevancia de las interacciones intramoleculares en la estabilidad de la PrP de conejo, con una mayor contribución aparente de residuos que participan en las interacciones entre el lazo $\beta 2-\alpha 2$ y las hélices- $\alpha 2$ y $\alpha 3$. No obstante, los resultados también demuestran que mutaciones puntuales pueden causar cambios imprevisibles y en zonas alejadas de la propia mutación, por lo que sería de gran interés estudiar los cambios que causa cada mutación puntual crítica observados a lo largo de esta tesis doctoral, como la mutación I202V en la estructura tridimensional de la PrP de conejo, de forma similar a como se ha hecho con los mutantes S173N e I214V. Por último, no se puede dejar de lado el estudio realizado por Qasim Khan y colaboradores, una parte del cual se explica en detalle en el apartado 10 de Resultados, donde tratamos de reproducir el análisis comparativo de la propensión a adquirir conformación estado- β de las PrP recombinantes de ratón, conejo y conejo I202V frente al tratamiento con agentes caotrópicos seguido por DC. Sin embargo, apenas se menciona una segunda parte del mismo estudio en que resuelve por cristalografía de rayos X la estructura de la PrP de conejo (121-230) con la intención de dar con el mecanismo por el que la PrP de conejo con la mutación N173S presenta una mayor tendencia a adquirir conformación estado- β que la PrP de conejo wt. Así, describen la formación de una corta hélice 3_{10} (también vista por RMN) en el lazo $\beta 2-\alpha 2$ mediante puentes de hidrógeno entre P164-D166 y V165-Q167 y más importante, encuentran una estructura nueva cerca de la hélice- $\alpha 2$ formada por el doble puente de hidrógeno entre N169 y S173. Además de estas interacciones fuertes, los residuos flanqueantes hidrofóbicos V165, Y168, F174 e Y217 forman un bolsillo hidrofóbico que estabilizan el lazo $\beta 2-\alpha 2$ y las hélices- $\alpha 2$ y $\alpha 3$ (Figura 35). Juntas estas interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas forman un motivo estructural que ejerce de tapa de la hélice y que denominaron “grapa hidrofóbica” (del inglés, *hydrophobic staple*).

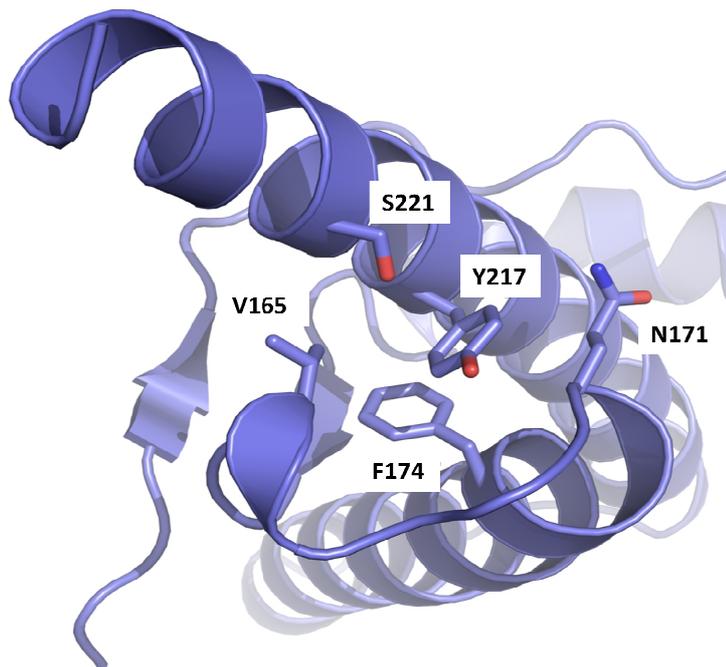


Figura 35. Interacciones de largo alcance entre el lazo $\beta 2$ - $\alpha 2$ y la hélice- $\alpha 3$. Los residuos V165 y F174 forman contactos hidrofóbicos con el residuo Y217. También se forman interacciones polares entre el residuo N171 y la hélice- $\alpha 3$ (De (Khan, Sweeting et al. 2010)).

La infrecuente aparición de Serina en la posición 173, clave para el segundo puente de hidrógeno, sugiere que esta grapa hidrofóbica podría ser la responsable directa de la elevada estabilidad conformacional de la PrP de conejo, viendo que el mutante S173N presenta una mayor tendencia a adquirir estado- β (Khan, Sweeting et al. 2010). La relevancia de este motivo estructural viene también respaldada por otro estudio similar, en que los residuos 169 y 173 se sustituyen en la PrP de hámster por los aminoácidos que presenta la PrP de conejo y viceversa. Mediante la resolución de sus estructuras cristalográficas y observación de su propensión a adquirir estado- β frente a la desnaturalización con urea, revelaron que estas mutaciones deshacían el motivo descrito en la PrP de conejo y lo incorporaban en el caso de la PrP de hámster mutada y afectaban a su propensión a adquirir estado- β de la forma esperada, reduciéndolo en el caso del hámster y aumentándolo en el caso del conejo (Sweeting, Brown et al. 2013). No obstante, los estudios que implican la adquisición de estado- β por efecto de agentes desnaturalizantes deben considerarse con extrema cautela, puesto que no se conoce cómo se correlaciona la propensión a adquirir estado- β *in vitro*, con la susceptibilidad a EETs *in vivo*, aspecto que se discutirá en mayor profundidad más adelante.

Así pues, a pesar de haberse detectado diversos motivos estructurales únicos, característicos de lepóridos que se han correlacionado con su tendencia al malplegamiento *in vitro*, en la mayoría de casos se desconoce si realmente son relevantes para el malplegamiento *in vivo*. Además, la imprevisibilidad del efecto que tienen cambios puntuales en regiones determinadas sobre regiones distantes de la PrP (Fernandez-Funez, Zhang et al. 2011), hace que sea necesario determinar el mayor número de estructuras de PrP mutadas posibles, correlacionándolos, siempre que se pueda, con estudios de malplegamiento *in vitro* y *ex vivo* o de transmisibilidad *in vivo*. La información acerca de cambios posiblemente relevantes para la susceptibilidad al malplegamiento de la PrP de conejo que se han obtenido en esta tesis doctoral, sería un buen punto de partida para la selección de mutaciones cuyo estudio estructural detallado sería de gran interés.

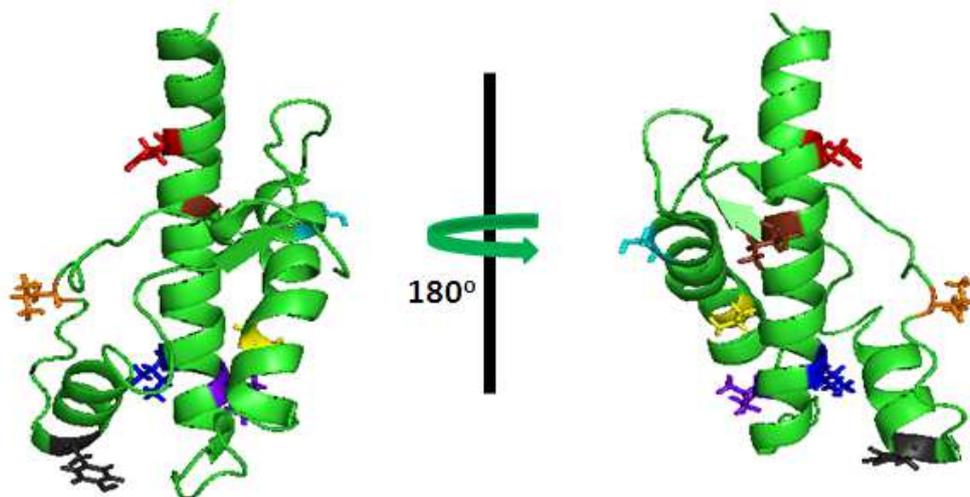


Figura 36. Estructura obtenida por RMN de la PrP de conejo wt (124-228) (Código PDB: 2FJ3) con los residuos que se sustituirán por aminoácidos de la PrP de ratón señalados. Residuos L137 (naranja), Y144 (gris), S173 (azul claro), V183 (amarillo), I202 (morado), I204 (azul marino), I214 (marrón) y Q219 (rojo). El L137 se encuentra en el lazo entre la hoja- β 1 y hélice- α 1, probablemente con poca relevancia en interacciones intramoleculares y su sustitución por el aminoácido de la PrP de ratón presumiblemente no debería causar perturbaciones mayores en la estructura de la proteína. El resto de residuos se encuentran dentro de estructuras secundarias bien definidas y por consiguiente, su sustitución por aminoácidos de la PrP de ratón podría tener un mayor efecto en la estructura tridimensional global de la PrP. El residuo I202 (morado), uno de los que mayor efecto parece tener sobre la susceptibilidad al malplegamiento *in vitro* de la PrP de conejo, se encuentra en una zona de la hélice- α 3 que por su cercanía a la hélice- α 2 podría ser una zona de interacción entre ambas, cuya alteración explicaría el cambio en la capacidad de malplegamiento. Figuras creadas con el software PyMol.

Además, el estudio de barreras de transmisión mediante rec-PMCA permite también estudios más detallados de las posiciones clave detectadas, aportando información adicional que podría ser de gran utilidad a la hora de seleccionar mutantes para estudios estructurales y su posterior interpretación. Con esta intención se han realizado, por ejemplo, cambios aminoacídicos alternativos en posiciones con mayor influencia sobre la capacidad de propagar el malplegamiento de la PrP recombinante de conejo; combinaciones de mutantes para ver si podrían tener efectos cooperativos o, en cambio, interferir entre sí; o la adición de semillas de diversos orígenes sobre los mutantes más susceptibles a RML, con la intención de comprobar si dichas mutaciones afectan única y específicamente a la barrera interespecies entre ratón y conejo o si, por el contrario, podrían estar facilitando el malplegamiento de la PrP de conejo frente a cualquier cepa priónica.

Tal y como se detalla en el apartado 6 de Resultados, el estudio del efecto de los cambios aminoacídicos alternativos pretendía aclarar si la ausencia del aminoácido original es suficiente para incrementar la susceptibilidad o el aminoácido por el que se sustituye resulta ser el factor más crítico. Para ello, escogimos los mutantes que muestran una mayor susceptibilidad frente al RML, el M108L y el I202V y a pesar de que podríamos haber escogido cualquier aminoácido para realizar la sustitución alternativa, optamos por escoger el cambio en función de los aminoácidos que ya existen en esas mismas posiciones en otras especies de mamífero, como una forma de garantizar que la estructura general de la PrP mutada no sufriera alteraciones estructurales drásticas (Billeter, Riek et al. 1997). Además, este experimento podría resultar también interesante para comprobar si la identidad de secuencia entre las PrPs del sustrato y del inóculo son tan determinantes en la barrera de transmisión como se creía (Scott, Foster et al. 1989) o si por el contrario, está regida por compatibilidad estructural, que no necesariamente dependería de la similitud de secuencias primarias (Moore, Vorberg et al. 2005). Nuestros resultados muestran que las PrPs de conejo mutadas, tanto M108L como el alternativo M108I, no resultan en diferencias significativas en su capacidad de propagar el malplegamiento de RML, lo que no es de extrañar teniendo en cuenta la similitud de ambos aminoácidos. En este caso, la similitud de ambas secuencias parece irrelevante frente a la similitud estructural, ya que probablemente el cambio estructural que podría causar la sustitución de una Metionina por una Leucina no diferiría mucho del causado por una Isoleucina, aminoácidos isoméricos, en una región sin estructura secundaria definida como es el extremo amino terminal de la PrP. Respecto a la posición I202, sí que se detectan diferencias en la capacidad de propagación de RML, pareciendo más susceptible a la misma la que contiene la sustitución de la PrP de ratón, I202V. La sustitución alternativa, aunque también susceptible al malplegamiento con recRML, no pudo malplegarse con BrainRML en 20 rondas de rec-PMCA, por lo que

en este caso, parecería que la identidad de secuencia primaria de las PrPs del sustrato y del inóculo es relevante. Sin embargo, al desconocerse el efecto estructural tanto de la sustitución por Valina como por Metionina de la Isoleucina 202, tampoco podría descartarse que en realidad sea la conformación tridimensional local la que determina la capacidad de propagar el malplegamiento de la RML, siendo más probable que el cambio a un aminoácido idéntico confiera mayor similitud estructural entre las PrPs de conejo y ratón.

La evaluación del efecto de varias mutaciones simultáneas en la PrP de conejo sobre su susceptibilidad al malplegamiento que se muestra en el apartado 8 de Resultados, es imprescindible en vista de los resultados previamente mencionados obtenidos en nuestro laboratorio durante el estudio de la barrera de transmisión entre ganado ovino y cérvidos. Como se ha comentado previamente, la PrP recombinante ovina modificada para contener lazo rígido (S173N N177T) fue incapaz de propagar el malplegamiento de la cepa EDC a pesar de la identidad casi completa de la estructura del lazo $\beta 2$ - $\alpha 2$. No obstante, la adición a esta PrP mutada del cambio aminoacídico I208M que aumentaba aún más la similitud entre las secuencias primarias de la PrP ovina y de ciervo, alteró completamente los resultados, demostrando que determinados cambios aminoacídicos pueden tener una gran influencia sobre otros distantes (ref. tesis CHF). Así mismo, varios de los estudios estructurales discutidos también apuntan a que interacciones de largo alcance podrían resultar críticas ((Wen, Li et al. 2010), (Wen, Li et al. 2010)), respaldando la necesidad de evaluar posibles efectos cooperativos en PrPs con múltiples mutaciones. Por limitación de tiempo, resultó imposible evaluar todas las combinaciones de mutaciones puntuales con efecto individual sobre la capacidad de propagación de RML, por lo que se decidió centrarse en las combinaciones de las tres mutaciones que mayor efecto parecen tener sobre la susceptibilidad al malplegamiento de la PrP de conejo. Por tanto, se escogieron las mutaciones S107N, M108L e I202V, que en caso de actuar de forma cooperativa en la determinación de la barrera de transmisión interespecies, aún en el contexto de la PrP recombinante de conejo, deberían permitir la propagación de recRML en una sola ronda de rec-PMCA. No obstante, no se apreciaron diferencias significativas entre los mutantes con una única mutación puntual y los dobles mutantes y el triple. La PrP con la mutación triple, que es la más similar en secuencia al RML, no muestra mayor capacidad de malplegamiento que mutantes con sustituciones únicas, descartando el efecto cooperativo de las mismas en la determinación de la barrera de transmisión y apuntando además a que la mayor similitud de secuencias primarias no necesariamente implica una menor barrera de transmisión.

A lo largo de esta tesis doctoral ya se ha mencionado cómo los polimorfismos en el gen del PrP de una misma especie pueden influir en gran medida en su susceptibilidad o resistencia a la infección por determinada cepa priónica, como demuestran ampliamente los numerosos estudios de transmisibilidad en ganado ovino (Baylis and Goldmann 2004). Principalmente los polimorfismos que aparecen en las posiciones 136, 154 y 171 se han relacionado con la susceptibilidad a scrapie, llevando al genotipado sistemático y puesta en práctica de programas de selección genética para erradicar el scrapie y la EEB ovina ((Belt, Muileman et al. 1995), (Goldmann, Baylis et al. 2005)). Para ello, se ha establecido una clasificación que relaciona el genotipo con el riesgo de contraer scrapie basado en los haplotipos descritos en las posiciones 136, 154 y 171 en la PrP ovina ($X^{136}X^{154}X^{171}$), con las siguientes seis combinaciones que muestran una mayor frecuencia de aparición en la naturaleza, ordenados según su susceptibilidad a scrapie: VRQ>ARQ>AHQ>ALQ>ARK>ARR ((Dawson, Hoinville et al. 1998), (Baylis, Houston et al. 2000)). No obstante, la susceptibilidad de estos genotipos a nuevas cepas de scrapie denominadas atípicas, debido entre otros al distinto patrón bioquímico que muestra la PrP^{Sc} frente al del scrapie clásico, cambia completamente, siendo el haplotipo ARR el que presenta mayor riesgo de padecer scrapie atípico, mientras el VRQ es de los menos susceptibles (Fediaevsky, Calavas et al. 2010). Aplicado a una especie altamente resistente a enfermedades priónicas como el conejo, se planteó si el efecto de susceptibilización al malplegamiento causado por las sustituciones introducidas resulta específico para la barrera entre conejo y ratón, y concretamente para la cepa RML, o si por el contrario, podrían tener un efecto más general sobre la capacidad de malplegamiento de la PrP recombinante de conejo frente a diversos priones de orígenes diferentes. Para ello, tal y como se detalla en el apartado 9 de Resultados, se añadieron semillas de otras especies utilizadas inicialmente para tratar de malplegar la PrP recombinante de conejo a los sustratos basados en las PrP mutantes de conejo más susceptibles, S107N, M108L e I202V: ME7, una cepa de scrapie previamente adaptada a ratón y proveniente del encéfalo de un ratón afectado; SSBP-1 (del inglés, *Sheep scrapie brain pool 1*), una cepa de scrapie ovina obtenido de encéfalo de ovejas afectadas; sheepBSE, una cepa de EEB previamente adaptada a ovejas y proveniente del encéfalo de un ratón transgénico para la PrP ovina afectado y la cepa causante del EEB en ganado bovino, proveniente del encéfalo de una vaca afectada (más detalles en la Tabla 1 de Materiales y Métodos). Inesperadamente, las 3 PrP recombinantes mutadas fueron capaces de propagar todas las semillas utilizadas, con ciertos casos especialmente llamativos como la gran susceptibilidad del I202V que da lugar a PrP^{res} en un número de rondas de rec-PMCA inferior al que se necesitó para el RML de encéfalo y es tan susceptible al SSBP-1 como el ratón.

Por tanto, los resultados anteriores, parecen apuntar hacia una susceptibilidad general de la PrP de conejo más que específica para ratón o el RML. Como se ha discutido previamente, la PrP de conejo wt presenta ciertas características estructurales únicas, que se han propuesto como elementos que confieren una gran estabilidad a la conformación nativa de dicha PrP y por consiguiente responsables de su elevada resistencia al malplegamiento. Aunque aún no se sabe si la estabilidad de la conformación nativa está relacionada con la susceptibilidad a enfermedades priónicas, se sabe que la formación de PrP^{Sc} implica un cambio estructural de la PrP^C, mayoritariamente α -helicoidal, a una estructura mayoritariamente compuesta por hoja- β . Por tanto, la estabilidad de la estructura nativa de la PrP podría influir en su propensión al malplegamiento inducido por priones. Además, se sabe desde hace mucho, que bajo condiciones ligeramente desestabilizantes la PrP puede adquirir un estado mayoritariamente β -estructurado (denominado estado- β), que como propusieron Horneman y colaboradores podría tratarse de un intermediario entre los estados nativo y desplegado en la vía de plegamiento de la PrP ((Zhang and Rich 1997), (Hornemann and Glockshuber 1998)). A pesar de la controversia acerca de la existencia de monómeros β -estructurados ((Baskakov, Legname et al. 2001), (Gerber, Tahiri-Alaoui et al. 2008)), un estudio realizado por Qasim Khan y colaboradores demuestra que pequeños cambios en una solución de PrP, como la adición de agentes caotrópicos, tiene gran influencia sobre la fracción de PrP que adquiere estado- β , proponiendo esta propensión a la adquisición de estado- β como determinante para la susceptibilidad de dicha especie de mamífero a enfermedades priónicas. Así, mediante la medición de las transiciones estructurales inducidas en la PrP por adición de urea utilizando el DC a dos longitudes de onda, vieron que las PrPs de las 5 especies podían presentar al menos 3 estados conformacionales distintos (nativo, desplegado y estado- β intermedio) y que la mayor propensión a adquirir el estado- β en pH menos ácidos se correlacionaba con una mayor susceptibilidad a las enfermedades priónicas *in vivo* (Khan, Sweeting et al. 2010). Tal y como muestran los resultados obtenidos por Qasim Khan y colaboradores (Figura X) la PrP recombinante de hámster es la que tiene mayor propensión a adquirir estado- β en entornos menos ácidos, seguida por la de ratón, conejo, caballo y perro, coincidiendo con la susceptibilidad a EETs que se les achaca *in vivo*.

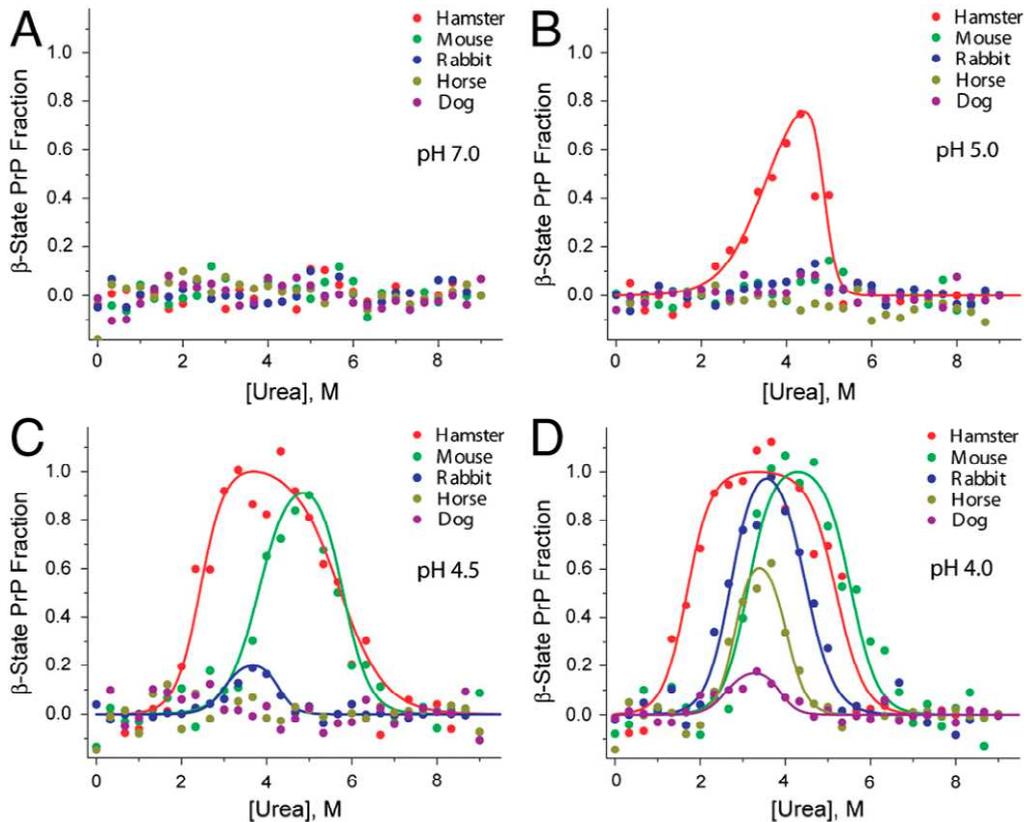


Figura 37. Comparación de la fracción de PrP recombinante que adquiere estado- β entre las PrP recombinantes (90-231) de hámster (rojo), ratón (verde), conejo (azul), caballo (amarillo) y perro (morado) en función de la concentración de urea a pH A) 7, B) 5, C) 4.5 y D) 4 (De (Khan, Sweeting et al. 2010)).

Además de las PrPs de diferentes especies, utilizaron el mismo método para analizar si la mutación S173N en la PrP de conejo influía en su propensión a adquirir estado- β , de forma que pudieran establecer una correlación entre los resultados obtenidos por Vorberg y colaboradores en que dicho cambio bloqueaba la capacidad de propagación de priones murinos. Y vieron que, tal y como esperaban, la mutación S173N daba a la PrP de conejo una mayor propensión a adquirir el estado- β . Interesados en si realmente este método podría predecir la susceptibilidad de una determinada PrP al malplegamiento y también en comprobar si la mutación que más parece susceptibilizar la PrP de conejo al malplegamiento lo hace por desestabilización de la estructura nativa de la misma, se decidió aplicar este método a nuestras PrP recombinantes de conejo y conejo I202V, utilizando las PrPs de ratón y hámster como controles. En contraposición con lo que observaron Qasim Khan y colaboradores, aunque se detectan diferencias similares entre hámster y el resto de PrPs, no se aprecian diferencias significativas en la propensión a adquirir estado- β entre las PrPs de ratón, conejo wt y conejo I202V. Este mismo método ha sido utilizado posteriormente en otro estudio procedente del mismo grupo de investigación,

en que realizan sustituciones de hámster en los codones 169 y 173 de la PrP de conejo y viceversa, y relacionan la disrupción de la grapa hidrofóbica previamente mencionada con una mayor propensión a adquirir estado- β y por consiguiente con la susceptibilidad (Sweeting, Brown et al. 2013). Sin embargo, aunque puede que en el caso del motivo estructural del lazo $\beta 2-\alpha 2$, sí que se de una desestabilización de la conformación nativa que se traduce en una mayor facilidad a adquirir estado- β en presencia de agentes caotrópicos; por una parte no se sabe cómo se relaciona este fenómeno con la susceptibilidad a EETs *in vivo*, y por otra parte, puede que no todos los cambios que vuelvan determinada PrP más susceptible al malplegamiento inducido por priones la vuelvan también más sensible a la desnaturalización por agentes caotrópicos. De hecho, un estudio realizado por Julien y colaboradores en que investigan si PrPs de diferentes especies presentan diferencias en el patrón de desplegamiento de regiones específicas ante la desnaturalización con urea seguido por RMN, sugieren que la formación de PrP^{Sc} no está necesariamente relacionada con la estabilidad global de la PrP^C. Mediante la comparación de los patrones de desplegamiento de las PrP recombinantes de hámster, ratón, conejo y vaca, pretendían estudiar si hay realmente correlación entre la estabilidad global y regional de la PrP nativa ante agentes desnaturalizantes y su susceptibilidad a padecer enfermedades priónicas *in vivo*. Según sus resultados, la PrP de hámster presenta la menor estabilidad, seguida de la PrP de ratón, de conejo y finalmente la de vaca, lo que no concuerda con la susceptibilidad relativa que presentan estas especies a la infección con priones *in vivo*. Además, también estudian mediante el mismo método, la PrP recombinante de conejo S173N y no observan diferencias significativas en la estabilidad comparada con la PrP de conejo wt, sugiriendo que esta mutación no afecta a la estabilidad global de la PrP, aunque no pueden descartar que cause desestabilización a nivel local. De cualquier forma, defienden que el evento inicial durante el malplegamiento de PrP inducido por urea, es la disociación de las hojas- β independientemente de la especie estudiada, en concordancia con la hipótesis de que la disociación de las hojas- β es un evento temprano y esencial en el malplegamiento de la PrP^C inducido por PrP^{Sc} (Paramithiotis, Pinard et al. 2003). Y que la propensión de la PrP al malplegamiento a una forma infecciosa no puede predecirse en función de la susceptibilidad que presenta cada PrP a la desnaturalización con agentes caotrópicos, puesto que especies más resistentes a EETs como el conejo muestran menor estabilidad estructural que especies susceptibles como el ganado bovino (Julien, Chatterjee et al. 2011).

Además de detectar residuos de interés que podrían tener gran influencia en la baja susceptibilidad a EETs y obtener *in vitro* PrP^{res} recombinantes de conejo wt a partir de las PrPs con sustituciones de ratón malplegadas, en esta tesis doctoral se ha tratado de caracterizar

bioquímicamente estas nuevas PrP^{res}. Por un lado, impulsados por la necesidad de asegurar que además de la resistencia a PK presentan otras características propias de los priones como la capacidad de autopropagación; y por otro, porque partiendo de las diferentes PrP mutadas malplegadas con RML como semilla podrían haberse generado diversas cepas con distintas características. De hecho, la generación de múltiples cepas no sería de extrañar de acuerdo con lo propuesto por Charles Weissmann y colaboradores. Se basan en diversas observaciones como el hecho de que la eficiencia de transmisión interespecies de priones es generalmente baja pero se incrementa tras pases seriados en la nueva especie huésped, lo que sugiere un proceso de adaptación que podría implicar mutación y selección. O el hecho de que incluso en una misma especie, la transmisión de priones entre distintos tipos celulares implica una selección de cepas o “sub-cepas” favorecidas, o en la detección de sub-poblaciones de PrP^{res} que adquieren resistencia a inhibidores del malplegamiento presentes durante su propagación. En vista de estos fenómenos, propusieron que durante su malplegamiento una determinada PrP puede adquirir una gran variedad de conformaciones, de forma que las PrP^{res}, sobre todo las generadas *in vitro*, se presentan como una población heterogénea de cepas o “sub-cepas” de las que, la que propaga con mayor eficiencia en un determinado ambiente es seleccionada (Weissmann, Li et al. 2011). Así pues, además de las mutaciones puntuales que podrían dar lugar a diversidad estructural de las PrP^{res} recombinantes generadas, el propio proceso de malplegamiento podría estar dando lugar a poblaciones heterogéneas de PrP^{res} de las que surgirían cepas y sub-cepas bajo cualquier presión selectiva como la propagación en un nuevo sustrato.

En nuestro caso, ya se ha demostrado mediante propagación en una única ronda de rec-PMCA, que las PrP^{res} generados tienen capacidad autopropagativa y su resistencia PK también ha quedado más que probada. A pesar de provenir todas las PrP^{res} de la misma cepa de prion murino, las distintas capacidades autopropagativas que muestran las PrP^{res} de conejo con mutaciones puntuales pueden explicarse fácilmente por las diferencias en la secuencia primaria de cada PrP y teniendo en cuenta la capacidad de la PMCA para replicar la adaptación de cepa que se da *in vivo* (Castilla, Morales et al. 2008). No obstante, que una vez adaptadas a PrP recombinante de conejo wt sigan mostrando distintas eficiencias de autopropagación, nos llevó a pensar que la adaptación del RML al conejo wt a través de las PrP mutadas podría haber dado lugar a la selección de de PrP^{res} con distintas propiedades bioquímicas y por consiguiente biológicas (Weissmann, Li et al. 2011). La generación de PrP^{res} recombinantes con distintas propiedades de cepa también ha sido previamente documentada (Colby, Giles et al. 2009), por lo que viendo las distintas capacidades de propagación de las PrP^{res} generadas, decidimos analizar en mayor detalle otra de las propiedades bioquímicas distintivas de las diferentes

cepas como el patrón de resistencia a PK (Colby, Giles et al. 2009). Como se muestra en el apartado 5 de Resultados, todas las PrP^{res} generadas en sustrato basado en PrP recombinante de conejo wt, presentan un patrón de resistencia a PK muy similar entre sí y en comparación con el RML recombinante murino original. Así pues, teniendo en cuenta que las diferencias en la capacidad de propagación entre las distintas PrP^{res} se reducen al pasarlas todas a PrP recombinante de conejo wt y que además muestran una resistencia a PK muy similar, parece que las características de cepa del RML podrían haberse mantenido tal y como sucede en la PMCA basada en homogenizados de encéfalo (Castilla, Gonzalez-Romero et al. 2008). De hecho, algunas propiedades de la PMCA basada en homogenizados de encéfalo, ya empiezan a verse también en sistemas de propagación *in vitro* basados en PrP recombinante, como la especificidad de especie (Kocisko, Priola et al. 1995), la capacidad de reproducir barreras de transmisión ((Kirby, Birkett et al. 2003), (Panza, Luers et al. 2010), ref. tesis CHF) o la posibilidad de obtener PrP^{res} con distintas características bioquímicas y biológicas (Colby, Giles et al. 2009).

Ya se ha comentado al principio de este mismo apartado, que los distintos sistemas de malplegamiento de PrP *in vitro*, sobre todo los basados en PrP recombinante como sustrato, pueden dar lugar a agregados de diversos tipos. Y que éstos, a pesar de presentar características bioquímicas propias de la PrP^{Sc}, pueden ser tanto infecciosos como no infecciosos *in vivo* por factores desconocidos ((Timmes, Moore et al. 2013), (Noble, Wang et al. 2015) y revisado en (Diaz-Espinoza and Soto 2012)). En este sentido, cabe destacar que se ha intentado evitar la utilización del concepto de prion recombinante o PrP^{Sc} recombinante a favor de PrP^{res}, ya que la principal característica que define un prion es su capacidad de causar enfermedad en animales inoculados y durante la realización de este trabajo ha sido imposible realizar inoculaciones *in vivo*. Por lo que a pesar de presentar determinadas características propias de PrP^{Sc}, las PrP^{res} generadas durante esta tesis podrían no resultar infecciosas *in vivo*, lo cual es imposible de predecir y sólo podría esclarecerse definitivamente mediante inoculación en modelos animales adecuados. Sin embargo, la PMCA basada en homogenizados de encéfalo ya ha demostrado su utilidad para evaluar la infectividad *in vitro* y su correlación con los resultados *in vivo* ((Castilla, Gonzalez-Romero et al. 2008), (Castilla, Morales et al. 2008)), por lo que se decidió evaluar la infectividad de las PrP^{res} recombinantes generadas *in vitro*, utilizando homogenizados de encéfalo de ratones transgénicos que expresan la PrP^C de conejo wt (TgRab) como sustrato de PMCA. Debido a la barrera entre PrP recombinante y de encéfalo previamente discutida, la propagación en homogenizado de encéfalo de PrP^{res} recombinante suele estar altamente desfavorecida, demostrado también por los largos tiempos de incubación que presentan la mayoría de PrP^{res} recombinantes infecciosas al ser inoculados en modelos animales ((Legname, Baskakov et al. 2004), (Makarava, Kovacs et al. 2010)). Por

ello, en lugar de utilizar encéfalos de conejo wt homogenizados, nos decantamos por el uso de los encéfalos de TgRab, que presentan unos niveles de expresión de PrP^C 5-6 veces superiores a los encéfalos de conejo. Ya que la sobreexpresión de PrP se ha demostrado de gran utilidad *in vivo* para detección de priones que presentan muy baja infectividad y/o tiempos de incubación muy prolongados ((Sigurdson, Manco et al. 2006), (Makarava, Kovacs et al. 2010)).

A falta de validar los resultados obtenidos en la rec-PMCA en modelos animales y a pesar de que pueden no correlacionar perfectamente con lo observado *in vitro*, queda demostrada la utilidad de la rec-PMCA como herramienta para evaluar el efecto de cambios aminoacídicos en la propagación de priones y su transmisibilidad interespecies. Es más, en este caso particular, ha permitido el estudio detallado de la PrP de una especie que presenta una elevada resistencia a contraer enfermedades priónicas, por lo cual resulta prácticamente imposible de realizar en modelos animales. Las incongruencias que hayan podido observarse frente a otros modelos o que pudieran observarse al trasladar los estudios a modelos *in vivo*, aunque en algunos casos no vayan a poder solucionarse por deberse a características propias del sistema de propagación *in vitro*, pueden resultar de gran interés para una mayor comprensión del mecanismo de malplegamiento de PrP^C a PrP^{Sc}, de los factores que determinan las características de cepa o de las regiones que rigen la transmisibilidad. Así pues, además de aportar información y material de interés sobre la PrP de conejo para investigaciones posteriores, a lo largo de esta tesis doctoral, se han mostrado la versatilidad y las posibilidades que ofrece la rec-PMCA y se ha tratado de aportar un grano más de arena en el desarrollo de esta metodología.

CONCLUSIONES

1. La PrP recombinante de conejo no fue capaz de malplegarse por ninguno de los priones utilizados como semilla tras veinte rondas de PMCA, independientemente de su origen encefálico o recombinante.
2. Se generaron once PrP recombinantes de conejo con sustituciones aminoacídicas de ratón.
3. Ocho de las once PrP recombinantes mutadas propagaron el malplegamiento del prion murino recombinante.
4. Tres de las ocho PrP recombinantes capaces de malplegar el prion murino recombinante propagaron también un prion murino procedente de encéfalo, demostrando un comportamiento similar al de la PrP de ratón.
5. Aquellas PrP recombinantes modificadas capaces de propagar el malplegamiento proteico, mostraron propiedades priónicas características como la capacidad de autopropagación y la alta resistencia a proteasas.
6. Todos los priones recombinantes generados a partir de las proteínas recombinantes mutadas indujeron el malplegamiento de la PrP recombinante de conejo de genotipo salvaje después de una única ronda de PMCA.
7. Todos los priones recombinantes de conejo de genotipo salvaje resultantes mostraron un comportamiento de cepa similar.
8. Se generaron cuatro PrP recombinantes de conejo con múltiples sustituciones aminoacídicas, seleccionadas por mostrar una mayor influencia en su propensión al malplegamiento.
9. La combinación de estas tres sustituciones no representó diferencias en su capacidad de propagación de priones recombinantes murinos respecto a las proteínas con mutaciones individuales.
10. La sustitución aminoacídica alternativa de dos de las proteínas mutadas con una mayor propensión al malplegamiento, sugirió que este comportamiento viene determinado por la ausencia del residuo aminoacídico correspondiente a la PrP de conejo más que por la presencia de un aminoácido existente en la PrP murina.
11. Se generaron once PrP recombinantes de ratón con sustituciones aminoacídicas de conejo.
12. A excepción de una de las proteínas mutantes generadas, todas propagaron el malplegamiento de un prion murino recombinante en una única ronda de PMCA. Esto sugiere que cada uno de

los aminoácidos distintivos de conejo requiere de un contexto determinado para conferir resistencia al malplegamiento.

13. Las PrP recombinantes de conejo mutadas, seleccionadas por su comportamiento frente al prion murino RML, se evaluaron utilizando cepas de priones de otras especies mostrando inespecificidad en cuanto a su mayor tendencia al malplegamiento.
14. La PrP recombinante de conejo mutada con mayor propensión al malplegamiento, I202V, se estudió en su capacidad de adquirir un estado intermedio de malplegamiento en respuesta a la desnaturalización, no observándose diferencias significativas respecto a la PrP recombinante de conejo.

BIBLIOGRAFÍA

- Abid, K. and C. Soto (2006). "The intriguing prion disorders." *Cell Mol Life Sci* **63**(19-20): 2342-2351.
- Aguzzi, A. (2001). "Peripheral prion pursuit." *J Clin Invest* **108**(5): 661-662.
- Aguzzi, A. and A. M. Calella (2009). "Prions: protein aggregation and infectious diseases." *Physiol Rev* **89**(4): 1105-1152.
- Aguzzi, A., M. Heikenwalder and M. Polymenidou (2007). "Insights into prion strains and neurotoxicity." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(7): 552-561.
- Aguzzi, A., C. Sigurdson and M. Heikenwalder (2008). "Molecular mechanisms of prion pathogenesis." *Annu Rev Pathol* **3**: 11-40.
- Alper, T. (1972). "The nature of the scrapie agent." *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* **6**: 154-155.
- Anderson, R. M., C. A. Donnelly, N. M. Ferguson, M. E. Woolhouse, C. J. Watt, H. J. Udy, S. MaWhinney, S. P. Dunstan, T. R. Southwood, J. W. Wilesmith, J. B. Ryan, L. J. Hoinville, J. E. Hillerton, A. R. Austin and G. A. Wells (1996). "Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle." *Nature* **382**(6594): 779-788.
- Atarashi, R., R. A. Moore, V. L. Sim, A. G. Hughson, D. W. Dorward, H. A. Onwubiko, S. A. Priola and B. Caughey (2007). "Ultrasensitive detection of scrapie prion protein using seeded conversion of recombinant prion protein." *Nat Methods* **4**(8): 645-650.
- Atarashi, R., J. M. Wilham, L. Christensen, A. G. Hughson, R. A. Moore, L. M. Johnson, H. A. Onwubiko, S. A. Priola and B. Caughey (2008). "Simplified ultrasensitive prion detection by recombinant PrP conversion with shaking." *Nat Methods* **5**(3): 211-212.
- Aucouturier, P., R. J. Kascsak, B. Frangione and T. Wisniewski (1999). "Biochemical and conformational variability of human prion strains in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease." *Neurosci Lett* **274**(1): 33-36.
- Badrick, A. C. and C. E. Jones (2009). "The amyloidogenic region of the human prion protein contains a high affinity (Met)(2)(His)(2) Cu(I) binding site." *J Inorg Biochem* **103**(8): 1169-1175.
- Balkema-Buschmann, A., C. Fast, M. Kaatz, M. Eiden, U. Ziegler, L. McIntyre, M. Keller, B. Hills and M. H. Groschup (2011). "Pathogenesis of classical and atypical BSE in cattle." *Prev Vet Med* **102**(2): 112-117.
- Barlow, R. M. and J. C. Rennie (1976). "The fate of ME7 scrapie infection in rats, guinea-pigs and rabbits." *Res Vet Sci* **21**(1): 110-111.
- Baron, G. S., A. G. Hughson, G. J. Raymond, D. K. Offerdahl, K. A. Barton, L. D. Raymond, D. W. Dorward and B. Caughey (2011). "Effect of glycans and the glycoposphatidylinositol anchor on strain dependent conformations of scrapie prion protein: improved purifications and infrared spectra." *Biochemistry* **50**(21): 4479-4490.
- Barron, R. M., V. Thomson, E. Jamieson, D. W. Melton, J. Ironside, R. Will and J. C. Manson (2001). "Changing a single amino acid in the N-terminus of murine PrP alters TSE incubation time across three species barriers." *EMBO J* **20**(18): 5070-5078.
- Bartz, J. C., C. Dejoia, T. Tucker, A. E. Kincaid and R. A. Bessen (2005). "Extraneural prion neuroinvasion without lymphoreticular system infection." *J Virol* **79**(18): 11858-11863.
- Bartz, J. C., A. E. Kincaid and R. A. Bessen (2003). "Rapid prion neuroinvasion following tongue infection." *J Virol* **77**(1): 583-591.
- Bartz, J. C., R. F. Marsh, D. I. McKenzie and J. M. Aiken (1998). "The host range of chronic wasting disease is altered on passage in ferrets." *Virology* **251**(2): 297-301.

Bartz, J. C., D. I. McKenzie, R. A. Bessen, R. F. Marsh and J. M. Aiken (1994). "Transmissible mink encephalopathy species barrier effect between ferret and mink: PrP gene and protein analysis." J Gen Virol **75 (Pt 11)**: 2947-2953.

Baskakov, I. V., G. Legname, M. A. Baldwin, S. B. Prusiner and F. E. Cohen (2002). "Pathway complexity of prion protein assembly into amyloid." J Biol Chem **277(24)**: 21140-21148.

Baskakov, I. V., G. Legname, S. B. Prusiner and F. E. Cohen (2001). "Folding of prion protein to its native alpha-helical conformation is under kinetic control." J Biol Chem **276(23)**: 19687-19690.

Basler, K., B. Oesch, M. Scott, D. Westaway, M. Walchli, D. F. Groth, M. P. McKinley, S. B. Prusiner and C. Weissmann (1986). "Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene." Cell **46(3)**: 417-428.

Baylis, M. and W. Goldmann (2004). "The genetics of scrapie in sheep and goats." Curr Mol Med **4(4)**: 385-396.

Baylis, M., F. Houston, W. Goldmann, N. Hunter and A. R. McLean (2000). "The signature of scrapie: differences in the PrP genotype profile of scrapie-affected and scrapie-free UK sheep flocks." Proc Biol Sci **267(1457)**: 2029-2035.

Belt, P. B., I. H. Muileman, B. E. Schreuder, J. Bos-de Ruijter, A. L. Gielkens and M. A. Smits (1995). "Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie." J Gen Virol **76 (Pt 3)**: 509-517.

Beringue, V., L. Herzog, E. Jaumain, F. Reine, P. Sibille, A. Le Dur, J. L. Vilotte and H. Laude (2012). "Facilitated cross-species transmission of prions in extraneural tissue." Science **335(6067)**: 472-475.

Berman, H., T. Battistuz, T. Bhat, W. F. Bluhm, P. Bourne, K. Burkhardt, Z. Feng, G. Gilliland, L. Iype, S. Jain, P. Fagan, J. Marvin, D. Padilla, V. Ravichandran, B. Schneider, N. Thanki, H. Weissig, J. Westbrook and C. Zardecki (2002). "The Protein Data Bank." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **58(Pt 6 No 1)**: 899-907.

Berrow, N. S., D. Alderton, S. Sainsbury, J. Nettleship, R. Assenberg, N. Rahman, D. I. Stuart and R. J. Owens (2007). "A versatile ligation-independent cloning method suitable for high-throughput expression screening applications." Nucleic Acids Res **35(6)**: e45.

Bessen, R. A. and R. F. Marsh (1992). "Identification of two biologically distinct strains of transmissible mink encephalopathy in hamsters." J Gen Virol **73 (Pt 2)**: 329-334.

Bessen, R. A. and R. F. Marsh (1994). "Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy." J Virol **68(12)**: 7859-7868.

Biasini, E., J. A. Turnbaugh, U. Unterberger and D. A. Harris (2012). "Prion protein at the crossroads of physiology and disease." Trends Neurosci **35(2)**: 92-103.

Biljan, I., G. Giachin, G. Ilc, I. Zhukov, J. Plavec and G. Legname (2012). "Structural basis for the protective effect of the human prion protein carrying the dominant-negative E219K polymorphism." Biochem J **446(2)**: 243-251.

Billeter, M., R. Riek, G. Wider, S. Hornemann, R. Glockshuber and K. Wuthrich (1997). "Prion protein NMR structure and species barrier for prion diseases." Proc Natl Acad Sci U S A **94(14)**: 7281-7285.

Bolton, D. C., M. P. McKinley and S. B. Prusiner (1982). "Identification of a protein that purifies with the scrapie prion." Science **218(4579)**: 1309-1311.

Borchelt, D. R., M. Scott, A. Taraboulos, N. Stahl and S. B. Prusiner (1990). "Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells." J Cell Biol **110(3)**: 743-752.

Bossers, A., P. Belt, G. J. Raymond, B. Caughey, R. de Vries and M. A. Smits (1997). "Scrapie susceptibility-linked polymorphisms modulate the in vitro conversion of sheep prion protein to protease-resistant forms." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(10): 4931-4936.

Bossers, A., R. de Vries and M. A. Smits (2000). "Susceptibility of sheep for scrapie as assessed by in vitro conversion of nine naturally occurring variants of PrP." J Virol **74**(3): 1407-1414.

Bradley, R., J. G. Collee and P. P. Liberski (2006). "Variant CJD (vCJD) and bovine spongiform encephalopathy (BSE): 10 and 20 years on: part 1." Folia Neuropathol **44**(2): 93-101.

Brandner, S., S. Isenmann, A. Raeber, M. Fischer, A. Sailer, Y. Kobayashi, S. Marino, C. Weissmann and A. Aguzzi (1996). "Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity." Nature **379**(6563): 339-343.

Bremer, J., F. Baumann, C. Tiberi, C. Wessig, H. Fischer, P. Schwarz, A. D. Steele, K. V. Toyka, K. A. Nave, J. Weis and A. Aguzzi (2010). "Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance." Nat Neurosci **13**(3): 310-318.

Browning, S. R., G. L. Mason, T. Seward, M. Green, G. A. Eliason, C. Mathiason, M. W. Miller, E. S. Williams, E. Hoover and G. C. Telling (2004). "Transmission of prions from mule deer and elk with chronic wasting disease to transgenic mice expressing cervid PrP." J Virol **78**(23): 13345-13350.

Bruce, M. E. (2003). "TSE strain variation." Br Med Bull **66**: 99-108.

Bruce, M. E. and H. Fraser (1991). "Scrapie strain variation and its implications." Curr Top Microbiol Immunol **172**: 125-138.

Budka, H., A. Aguzzi, P. Brown, J. M. Brucher, O. Bugiani, F. Gullotta, M. Haltia, J. J. Hauw, J. W. Ironside, K. Jellinger and et al. (1995). "Neuropathological diagnostic criteria for Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and other human spongiform encephalopathies (prion diseases)." Brain Pathol **5**(4): 459-466.

Bueler, H., A. Aguzzi, A. Sailer, R. A. Greiner, P. Autenried, M. Aguet and C. Weissmann (1993). "Mice devoid of PrP are resistant to scrapie." Cell **73**(7): 1339-1347.

Bueler, H., M. Fischer, Y. Lang, H. Bluethmann, H. P. Lipp, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, M. Aguet and C. Weissmann (1992). "Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein." Nature **356**(6370): 577-582.

Bueler, H., A. Raeber, A. Sailer, M. Fischer, A. Aguzzi and C. Weissmann (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**(1): 19-30.

Calzolari, L., D. A. Lysek, D. R. Perez, P. Guntert and K. Wuthrich (2005). "Prion protein NMR structures of chickens, turtles, and frogs." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(3): 651-655.

Carlson, G. A., P. A. Goodman, M. Lovett, B. A. Taylor, S. T. Marshall, M. Peterson-Torchia, D. Westaway and S. B. Prusiner (1988). "Genetics and polymorphism of the mouse prion gene complex: control of scrapie incubation time." Mol Cell Biol **8**(12): 5528-5540.

Carlson, G. A., D. T. Kingsbury, P. A. Goodman, S. Coleman, S. T. Marshall, S. DeArmond, D. Westaway and S. B. Prusiner (1986). "Linkage of prion protein and scrapie incubation time genes." Cell **46**(4): 503-511.

Cashman, N. R., R. Loertscher, J. Nalbantoglu, I. Shaw, R. J. Kascsak, D. C. Bolton and P. E. Bendheim (1990). "Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation." Cell **61**(1): 185-192.

Castilla, J., D. Gonzalez-Romero, P. Saa, R. Morales, J. De Castro and C. Soto (2008). "Crossing the species barrier by PrP(Sc) replication in vitro generates unique infectious prions." *Cell* **134**(5): 757-768.

Castilla, J., A. Gutierrez-Adan, A. Brun, D. Doyle, B. Pintado, M. A. Ramirez, F. J. Salguero, B. Parra, F. D. Segundo, J. M. Sanchez-Vizcaino, M. Rogers and J. M. Torres (2004). "Subclinical bovine spongiform encephalopathy infection in transgenic mice expressing porcine prion protein." *J Neurosci* **24**(21): 5063-5069.

Castilla, J., A. Gutierrez-Adan, A. Brun, B. Pintado, B. Parra, M. A. Ramirez, F. J. Salguero, F. Diaz San Segundo, A. Rabano, M. J. Cano and J. M. Torres (2004). "Different behavior toward bovine spongiform encephalopathy infection of bovine prion protein transgenic mice with one extra repeat octapeptide insert mutation." *J Neurosci* **24**(9): 2156-2164.

Castilla, J., A. Gutierrez Adan, A. Brun, B. Pintado, M. A. Ramirez, B. Parra, D. Doyle, M. Rogers, F. J. Salguero, C. Sanchez, J. M. Sanchez-Vizcaino and J. M. Torres (2003). "Early detection of PrPres in BSE-infected bovine PrP transgenic mice." *Arch Virol* **148**(4): 677-691.

Castilla, J., R. Morales, P. Saa, M. Barria, P. Gambetti and C. Soto (2008). "Cell-free propagation of prion strains." *EMBO J* **27**(19): 2557-2566.

Castilla, J., P. Saa, C. Hetz and C. Soto (2005). "In vitro generation of infectious scrapie prions." *Cell* **121**(2): 195-206.

Castilla, J., P. Saa, R. Morales, K. Abid, K. Maundrell and C. Soto (2006). "Protein misfolding cyclic amplification for diagnosis and prion propagation studies." *Methods Enzymol* **412**: 3-21.

Castilla, J., P. Saa and C. Soto (2005). "Detection of prions in blood." *Nat Med* **11**(9): 982-985.

Caughey, B., D. A. Kocisko, G. J. Raymond and P. T. Lansbury, Jr. (1995). "Aggregates of scrapie-associated prion protein induce the cell-free conversion of protease-sensitive prion protein to the protease-resistant state." *Chem Biol* **2**(12): 807-817.

Caughey, B. and G. J. Raymond (1991). "The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive." *J Biol Chem* **266**(27): 18217-18223.

Chakroun, N., A. Fornili, S. Prigent, J. Kleinjung, C. A. Dreiss, H. Rezaei and F. Fraternali (2013). "Decrypting Prion Protein Conversion into a beta-Rich Conformer by Molecular Dynamics." *J Chem Theory Comput* **9**(5): 2455-2465.

Chakroun, N., S. Prigent, C. A. Dreiss, S. Noinville, C. Chapuis, F. Fraternali and H. Rezaei (2010). "The oligomerization properties of prion protein are restricted to the H2H3 domain." *FASEB J* **24**(9): 3222-3231.

Chen, J. and D. Thirumalai (2013). "Helices 2 and 3 are the initiation sites in the PrP(C) --> PrP(SC) transition." *Biochemistry* **52**(2): 310-319.

Chesebro, B., B. Race, K. Meade-White, R. Lacasse, R. Race, M. Klingeborn, J. Striebel, D. Dorward, G. McGovern and M. Jeffrey (2010). "Fatal transmissible amyloid encephalopathy: a new type of prion disease associated with lack of prion protein membrane anchoring." *PLoS Pathog* **6**(3): e1000800.

Chesebro, B., M. Trifilo, R. Race, K. Meade-White, C. Teng, R. LaCasse, L. Raymond, C. Favara, G. Baron, S. Priola, B. Caughey, E. Masliah and M. Oldstone (2005). "Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie." *Science* **308**(5727): 1435-1439.

Chianini, F., N. Fernández-Borges, H. Eraña, Y. Pang, E. Vidal, S. Eaton, J. Finlayson, M. Dagleish and J. Castilla (2013). "Prion-resistant or prion-susceptible species, this is the question." *Virulence* **4**(4): 333-334.

Chianini, F., N. Fernandez-Borges, E. Vidal, L. Gibbard, B. Pintado, J. de Castro, S. A. Priola, S. Hamilton, S. L. Eaton, J. Finlayson, Y. Pang, P. Steele, H. W. Reid, M. P. Dagleish and J. Castilla (2012). "Rabbits are not resistant to prion infection." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(13): 5080-5085.

Cobb, N. J., F. D. Sonnichsen, H. McHaourab and W. K. Surewicz (2007). "Molecular architecture of human prion protein amyloid: a parallel, in-register beta-structure." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(48): 18946-18951.

Cobb, N. J. and W. K. Surewicz (2009). "Prion diseases and their biochemical mechanisms." Biochemistry **48**(12): 2574-2585.

Cohen, F. E. and S. B. Prusiner (1998). "Pathologic conformations of prion proteins." Annu Rev Biochem **67**: 793-819.

Colby, D. W., K. Giles, G. Legname, H. Wille, I. V. Baskakov, S. J. DeArmond and S. B. Prusiner (2009). "Design and construction of diverse mammalian prion strains." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(48): 20417-20422.

Collee, J. G., R. Bradley and P. P. Liberski (2006). "Variant CJD (vCJD) and bovine spongiform encephalopathy (BSE): 10 and 20 years on: part 2." Folia Neuropathol **44**(2): 102-110.

Collinge, J. (2001). "Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis." Annu Rev Neurosci **24**: 519-550.

Collinge, J., F. Owen, M. Poulter, M. Leach, T. J. Crow, M. N. Rossor, J. Hardy, M. J. Mullan, I. Janota and P. L. Lantos (1990). "Prion dementia without characteristic pathology." Lancet **336**(8706): 7-9.

Collinge, J., M. S. Palmer, K. C. Sidle, I. Gowland, R. Medori, J. Ironside and P. Lantos (1995). "Transmission of fatal familial insomnia to laboratory animals." Lancet **346**(8974): 569-570.

Collinge, J., K. C. Sidle, J. Meads, J. Ironside and A. F. Hill (1996). "Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD." Nature **383**(6602): 685-690.

Collinge, J., J. Whitfield, E. McKintosh, J. Beck, S. Mead, D. J. Thomas and M. P. Alpers (2006). "Kuru in the 21st century--an acquired human prion disease with very long incubation periods." Lancet **367**(9528): 2068-2074.

Creutzfeldt, H. (1920). "Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems." Z Gesamte Neurol Psychiatr **57**: 1-19.

Cronier, S., N. Gros, M. H. Tattum, G. S. Jackson, A. R. Clarke, J. Collinge and J. D. Wadsworth (2008). "Detection and characterization of proteinase K-sensitive disease-related prion protein with thermolysin." Biochem J **416**(2): 297-305.

Cuille, J. and P. Chelle (1936). "La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable?" CR Acad Sci. **203**: 1552-1554.

Danzer, K. and P. McLean (2011). "Drug targets from genetics: α -synuclein." CNS Neurol Disord Drug Targets **10**(6): 712-723.

Dawson, M., L. J. Hoinville, B. D. Hosie and N. Hunter (1998). "Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. Scrapie Information Group." Vet Rec **142**(23): 623-625.

Deleault, N. R., B. T. Harris, J. R. Rees and S. Supattapone (2007). "Formation of native prions from minimal components in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(23): 9741-9746.

Deleault, N. R., R. Kascsak, J. C. Geoghegan and S. Supattapone (2010). "Species-dependent differences in cofactor utilization for formation of the protease-resistant prion protein in vitro." Biochemistry **49**(18): 3928-3934.

DeMarco, M. L. and V. Daggett (2004). "From conversion to aggregation: protofibril formation of the prion protein." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(8): 2293-2298.

Di Bari, M. A., R. Nonno, J. Castilla, C. D'Agostino, L. Pirisinu, G. Riccardi, M. Conte, J. Richt, R. Kunkle, J. Langeveld, G. Vaccari and U. Agrimi (2013). "Chronic wasting disease in bank voles: characterisation of the shortest incubation time model for prion diseases." PLoS Pathog **9**(3): e1003219.

Diaz-Espinoza, R. and C. Soto (2012). "High-resolution structure of infectious prion protein: the final frontier." Nat Struct Mol Biol **19**(4): 370-377.

Dickinson, A. G. (1976). "Scrapie in sheep and goats." Front Biol **44**: 209-241.

Dickinson, A. G., V. M. Meikle and H. Fraser (1968). "Identification of a gene which controls the incubation period of some strains of scrapie agent in mice." J Comp Pathol **78**(3): 293-299.

Diringer, H., M. Beekes, M. Ozel, D. Simon, I. Queck, F. Cardone, M. Pocchiari and J. W. Ironside (1997). "Highly infectious purified preparations of disease-specific amyloid of transmissible spongiform encephalopathies are not devoid of nucleic acids of viral size." Intervirology **40**(4): 238-246.

Duffy, P., J. Wolf, G. Collins, A. G. DeVoe, B. Streeten and D. Cowen (1974). "Letter: Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease." N Engl J Med **290**(12): 692-693.

Eanes, E. and G. Glenner (1968). "X-ray diffraction studies on amyloid filaments." J Histochem Cytochem. **16**(11): 673-677.

Eghiaian, F., T. Daubenfeld, Y. Quenet, M. van Audenhaege, A. P. Bouin, G. van der Rest, J. Grosclaude and H. Rezaei (2007). "Diversity in prion protein oligomerization pathways results from domain expansion as revealed by hydrogen/deuterium exchange and disulfide linkage." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(18): 7414-7419.

Enari, M., E. Flechsig and C. Weissmann (2001). "Scrapie prion protein accumulation by scrapie-infected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(16): 9295-9299.

Faburay, B., D. Tark, A. G. Kanthasamy and J. A. Richt (2014). "In vitro amplification of scrapie and chronic wasting disease PrP(res) using baculovirus-expressed recombinant PrP as substrate." Prion **8**(6): 393-403.

Fediaevsky, A., D. Calavas, P. Gasqui, K. Moazami-Goudarzi, P. Laurent, J. N. Arzac, C. Ducrot and C. Moreno (2010). "Quantitative estimation of genetic risk for atypical scrapie in French sheep and potential consequences of the current breeding programme for resistance to scrapie on the risk of atypical scrapie." Genet Sel Evol **42**: 14.

Felten, D., S. Felten, S. Carlson, J. Olschowka and S. Livnat (1985). "Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue." The Journal of Immunology **135**(2): 755-765.

Fernandez-Borges, N., F. Chianini, H. Erana, E. Vidal, S. L. Eaton, B. Pintado, J. Finlayson, M. P. Dagleish and J. Castilla (2012). "Naturally prion resistant mammals: a utopia?" Prion **6**(5): 425-429.

Fernandez-Borges, N., J. de Castro and J. Castilla (2009). "In vitro studies of the transmission barrier." Prion **3**(4): 220-223.

Fernandez-Borges, N., H. Erana, S. R. Elezgarai, C. Harrathi, M. Gayosso and J. Castilla (2013). "Infectivity versus Seeding in Neurodegenerative Diseases Sharing a Prion-Like Mechanism." Int J Cell Biol **2013**: 583498.

Fernandez-Borges, N., H. Erana, V. Venegas, S. R. Elezgarai, C. Harrathi and J. Castilla (2015). "Animal models for prion-like diseases." Virus Res **207**: 5-24.

Fernandez-Funez, P., Y. Zhang, S. Casas-Tinto, X. Xiao, W. Q. Zou and D. E. Rincon-Limas (2010). "Sequence-dependent prion protein misfolding and neurotoxicity." *J Biol Chem* **285**(47): 36897-36908.

Fernandez-Funez, P., Y. Zhang, J. Sanchez-Garcia, K. Jensen, W. Q. Zou and D. E. Rincon-Limas (2011). "Pulling rabbits to reveal the secrets of the prion protein." *Commun Integr Biol* **4**(3): 262-266.

Fischer, M., T. Rulicke, A. Raeber, A. Sailer, M. Moser, B. Oesch, S. Brandner, A. Aguzzi and C. Weissmann (1996). "Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie." *EMBO J* **15**(6): 1255-1264.

Flechsig, E., D. Shmerling, I. Hegyi, A. J. Raeber, M. Fischer, A. Cozzio, C. von Mering, A. Aguzzi and C. Weissmann (2000). "Prion protein devoid of the octapeptide repeat region restores susceptibility to scrapie in PrP knockout mice." *Neuron* **27**(2): 399-408.

Fox, K. A., J. E. Jewell, E. S. Williams and M. W. Miller (2006). "Patterns of PrPCWD accumulation during the course of chronic wasting disease infection in orally inoculated mule deer (*Odocoileus hemionus*)." *J Gen Virol* **87**(Pt 11): 3451-3461.

Fraser, H. (1982). "Neuronal spread of scrapie agent and targeting of lesions within the retino-tectal pathway." *Nature* **295**(5845): 149-150.

Fraser, H. and M. Bruce (1973). "Argyrophilic plaques in mice inoculated with scrapie from particular sources." *Lancet* **1**(7803): 617-618.

Fraser, H. and A. G. Dickinson (1970). "Pathogenesis of scrapie in the mouse: the role of the spleen." *Nature* **226**(5244): 462-463.

Gabizon, R., M. P. McKinley and S. B. Prusiner (1987). "Purified prion proteins and scrapie infectivity copartition into liposomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(12): 4017-4021.

Gajdusek, C., C. Gibbs and M. Alpers (1966). "Experimental transmission of kuru-like syndrome to chimpanzees." *Nature* **209**: 794-796.

Gajdusek, D. C., C. J. Gibbs, Jr. and M. Alpers (1967). "Transmission and passage of experimental "kuru" to chimpanzees." *Science* **155**(3759): 212-214.

Gambetti, P., Z. Dong, J. Yuan, X. Xiao, M. Zheng, A. Alsheklee, R. Castellani, M. Cohen, M. A. Barria, D. Gonzalez-Romero, E. D. Belay, L. B. Schonberger, K. Marder, C. Harris, J. R. Burke, T. Montine, T. Wisniewski, D. W. Dickson, C. Soto, C. M. Hulette, J. A. Mastrianni, Q. Kong and W. Q. Zou (2008). "A novel human disease with abnormal prion protein sensitive to protease." *Ann Neurol* **63**(6): 697-708.

Gerber, R., A. Tahiri-Alaoui, P. J. Hore and W. James (2008). "Conformational pH dependence of intermediate states during oligomerization of the human prion protein." *Protein Sci* **17**(3): 537-544.

Gibbs, C. J., Jr. and D. C. Gajdusek (1973). "Experimental subacute spongiform virus encephalopathies in primates and other laboratory animals." *Science* **182**(4107): 67-68.

Gibbs, C. J., Jr., D. C. Gajdusek, D. M. Asher, M. P. Alpers, E. Beck, P. M. Daniel and W. B. Matthews (1968). "Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee." *Science* **161**(3839): 388-389.

Glatzel, M. and A. Aguzzi (2000). "PrP(C) expression in the peripheral nervous system is a determinant of prion neuroinvasion." *J Gen Virol* **81**(Pt 11): 2813-2821.

Goldmann, W., M. Baylis, C. Chihota, E. Stevenson and N. Hunter (2005). "Frequencies of PrP gene haplotypes in British sheep flocks and the implications for breeding programmes." *J Appl Microbiol* **98**(6): 1294-1302.

Goldmann, W., T. Martin, J. Foster, S. Hughes, G. Smith, K. Hughes, M. Dawson and N. Hunter (1996). "Novel polymorphisms in the caprine PrP gene: a codon 142 mutation associated with scrapie incubation period." *J Gen Virol* **77** (Pt 11): 2885-2891.

Gorfe, A. A. and A. Caflisch (2007). "Ser170 controls the conformational multiplicity of the loop 166-175 in prion proteins: implication for conversion and species barrier." *FASEB J* **21**(12): 3279-3287.

Gossert, A. D., S. Bonjour, D. A. Lysek, F. Fiorito and K. Wuthrich (2005). "Prion protein NMR structures of elk and of mouse/elk hybrids." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(3): 646-650.

Gough, K. C. and B. C. Maddison (2010). "Prion transmission: prion excretion and occurrence in the environment." *Prion* **4**(4): 275-282.

Govaerts, C., H. Wille, S. B. Prusiner and F. E. Cohen (2004). "Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(22): 8342-8347.

Green, K. M., J. Castilla, T. S. Seward, D. L. Napier, J. E. Jewell, C. Soto and G. C. Telling (2008). "Accelerated high fidelity prion amplification within and across prion species barriers." *PLoS Pathog* **4**(8): e1000139.

Griffith, J. S. (1967). "Self-replication and scrapie." *Nature* **215**(5105): 1043-1044.

Groveman, B. R., M. A. Dolan, L. M. Taubner, A. Kraus, R. B. Wickner and B. Caughey (2014). "Parallel in-register intermolecular beta-sheet architectures for prion-seeded prion protein (PrP) amyloids." *J Biol Chem* **289**(35): 24129-24142.

Hadlow, W. J. (1959). "Scrapie and Kuru." *Lancet* **2**: 289-290.

Hafner-Bratkovic, I., L. Gaedtke, A. Ondracka, P. Veranic, I. Vorberg and R. Jerala (2011). "Effect of hydrophobic mutations in the H2-H3 subdomain of prion protein on stability and conversion in vitro and in vivo." *PLoS One* **6**(9): e24238.

Hagiwara, K., H. Hara and K. Hanada (2013). "Species-barrier phenomenon in prion transmissibility from a viewpoint of protein science." *J Biochem* **153**(2): 139-145.

Haley, N. J., C. K. Mathiason, S. Carver, M. Zabel, G. C. Telling and E. A. Hoover (2011). "Detection of chronic wasting disease prions in salivary, urinary, and intestinal tissues of deer: potential mechanisms of prion shedding and transmission." *J Virol* **85**(13): 6309-6318.

Halliday, M. and G. R. Mallucci (2014). "Targeting the unfolded protein response in neurodegeneration: A new approach to therapy." *Neuropharmacology* **76 Pt A**: 169-174.

Halliez, S., B. Passet, S. Martin-Lanneree, J. Hernandez-Rapp, H. Laude, S. Mouillet-Richard, J. L. Vilotte and V. Beringue (2014). "To develop with or without the prion protein." *Front Cell Dev Biol* **2**: 58.

Hara, H., Y. Okemoto-Nakamura, F. Shinkai-Ouchi, K. Hanada, Y. Yamakawa and K. Hagiwara (2012). "Mouse prion protein (PrP) segment 100 to 104 regulates conversion of PrP(C) to PrP(Sc) in prion-infected neuroblastoma cells." *J Virol* **86**(10): 5626-5636.

Hayashi, H. K., T. Yokoyama, M. Takata, Y. Iwamaru, M. Imamura, Y. K. Ushiki and M. Shinagawa (2005). "The N-terminal cleavage site of PrP^{Sc} from BSE differs from that of PrP^{Sc} from scrapie." *Biochem Biophys Res Commun* **328**(4): 1024-1027.

Heppner, F. L., I. Arrighi, U. Kalinke and A. Aguzzi (2001). "Immunity against prions?" *Trends Mol Med* **7**(11): 477-479.

Hill, A. F. and J. Collinge (2004). "Prion strains and species barriers." *Contrib Microbiol* **11**: 33-49.

Hill, A. F., M. Desbruslais, S. Joiner, K. C. Sidle, I. Gowland, J. Collinge, L. J. Doey and P. Lantos (1997). "The same prion strain causes vCJD and BSE." *Nature* **389**(6650): 448-450, 526.

Hill, A. F., S. Joiner, J. Linehan, M. Desbruslais, P. L. Lantos and J. Collinge (2000). "Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(18): 10248-10253.

Hilton, D. A. (2006). "Pathogenesis and prevalence of variant Creutzfeldt-Jakob disease." J Pathol **208**(2): 134-141.

Hiraga, C., A. Kobayashi and T. Kitamoto (2009). "The number of octapeptide repeat affects the expression and conversion of prion protein." Biochem Biophys Res Commun **382**(4): 715-719.

Holscher, C., H. Delius and A. Burkle (1998). "Overexpression of nonconvertible PrPc delta114-121 in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells leads to trans-dominant inhibition of wild-type PrP(Sc) accumulation." J Virol **72**(2): 1153-1159.

Horiuchi, M. and B. Caughey (1999). "Specific binding of normal prion protein to the scrapie form via a localized domain initiates its conversion to the protease-resistant state." EMBO J **18**(12): 3193-3203.

Horiuchi, M., S. A. Priola, J. Chabry and B. Caughey (2000). "Interactions between heterologous forms of prion protein: binding, inhibition of conversion, and species barriers." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(11): 5836-5841.

Hornemann, S. and R. Glockshuber (1998). "A scrapie-like unfolding intermediate of the prion protein domain PrP(121-231) induced by acidic pH." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(11): 6010-6014.

Hornemann, S., C. Schorn and K. Wuthrich (2004). "NMR structure of the bovine prion protein isolated from healthy calf brains." EMBO Rep **5**(12): 1159-1164.

Hou, F., L. Sun, H. Zheng, B. Skaug, Q. X. Jiang and Z. J. Chen (2011). "MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response." Cell **146**(3): 448-461.

Howells, L. C., S. Anderson, N. G. Coldham and M. J. Sauer (2008). "Transmissible spongiform encephalopathy strain-associated diversity of N-terminal proteinase K cleavage sites of PrP(Sc) from scrapie-infected and bovine spongiform encephalopathy-infected mice." Biomarkers **13**(4): 393-412.

Hsiao, K., H. F. Baker, T. J. Crow, M. Poulter, F. Owen, J. D. Terwilliger, D. Westaway, J. Ott and S. B. Prusiner (1989). "Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome." Nature **338**(6213): 342-345.

Hsiao, K. K., C. Cass, G. D. Schellenberg, T. Bird, E. Devine-Gage, H. Wisniewski and S. B. Prusiner (1991). "A prion protein variant in a family with the telencephalic form of Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome." Neurology **41**(5): 681-684.

Hsiao, K. K., M. Scott, D. Foster, D. F. Groth, S. J. DeArmond and S. B. Prusiner (1990). "Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with mutant prion protein." Science **250**(4987): 1587-1590.

Imamura, M., N. Kato, M. Yoshioka, H. Okada, Y. Iwamaru, Y. Shimizu, S. Mohri, T. Yokoyama and Y. Murayama (2011). "Glycosylphosphatidylinositol anchor-dependent stimulation pathway required for generation of baculovirus-derived recombinant scrapie prion protein." J Virol **85**(6): 2582-2588.

Imran, M. and S. Mahmood (2011). "An overview of animal prion diseases." Virology **8**: 493.

Inoue, H., H. Nojima and H. Okayama (1990). "High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids." Gene **96**(1): 23-28.

Jackson, W. S., A. W. Borkowski, N. E. Watson, O. D. King, H. Faas, A. Jasanoff and S. Lindquist (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**(36): 14759-14764.

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.

Jeffrey, M. and L. Gonzalez (2007). "Classical sheep transmissible spongiform encephalopathies: pathogenesis, pathological phenotypes and clinical disease." Neuropathol Appl Neurobiol **33**(4): 373-394.

Jeffrey, M., I. A. Goodbrand and C. M. Goodsir (1995). "Pathology of the transmissible spongiform encephalopathies with special emphasis on ultrastructure." Micron **26**(3): 277-298.

Jeong, B. H. and Y. S. Kim (2014). "Genetic studies in human prion diseases." J Korean Med Sci **29**(5): 623-632.

Julien, O., S. Chatterjee, T. C. Bjorndahl, B. Sweeting, S. Acharya, V. Semenchenko, A. Chakrabartty, E. F. Pai, D. S. Wishart, B. D. Sykes and N. R. Cashman (2011). "Relative and regional stabilities of the hamster, mouse, rabbit, and bovine prion proteins toward urea unfolding assessed by nuclear magnetic resonance and circular dichroism spectroscopies." Biochemistry **50**(35): 7536-7545.

Junker, M., C. C. Schuster, A. V. McDonnell, K. A. Sorg, M. C. Finn, B. Berger and P. L. Clark (2006). "Pertactin beta-helix folding mechanism suggests common themes for the secretion and folding of autotransporter proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(13): 4918-4923.

Kaneko, K., L. Zulianello, M. Scott, C. M. Cooper, A. C. Wallace, T. L. James, F. E. Cohen and S. B. Prusiner (1997). "Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(19): 10069-10074.

Kazlauskaitė, J., A. Young, C. E. Gardner, J. V. Macpherson, C. Venien-Bryan and T. J. Pinheiro (2005). "An unusual soluble beta-turn-rich conformation of prion is involved in fibril formation and toxic to neuronal cells." Biochem Biophys Res Commun **328**(1): 292-305.

Khan, M. Q., B. Sweeting, V. K. Mulligan, P. E. Arslan, N. R. Cashman, E. F. Pai and A. Chakrabartty (2010). "Prion disease susceptibility is affected by beta-structure folding propensity and local side-chain interactions in PrP." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(46): 19808-19813.

Kim, J. I., I. Cali, K. Surewicz, Q. Kong, G. J. Raymond, R. Atarashi, B. Race, L. Qing, P. Gambetti, B. Caughey and W. K. Surewicz (2010). "Mammalian prions generated from bacterially expressed prion protein in the absence of any mammalian cofactors." J Biol Chem **285**(19): 14083-14087.

Kim, J. I., K. Surewicz, P. Gambetti and W. K. Surewicz (2009). "The role of glycoposphatidylinositol anchor in the amplification of the scrapie isoform of prion protein in vitro." FEBS Lett **583**(22): 3671-3675.

Kimberlin, R. H., S. Cole and C. A. Walker (1987). "Temporary and permanent modifications to a single strain of mouse scrapie on transmission to rats and hamsters." J Gen Virol **68 (Pt 7)**: 1875-1881.

Kimberlin, R. H., H. J. Field and C. A. Walker (1983). "Pathogenesis of mouse scrapie: evidence for spread of infection from central to peripheral nervous system." J Gen Virol **64 Pt 3**: 713-716.

Kimberlin, R. H., C. A. Walker and H. Fraser (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.

Kirby, L., C. R. Birkett, H. Rudyk, I. H. Gilbert and J. Hope (2003). "In vitro cell-free conversion of bacterial recombinant PrP to PrPres as a model for conversion." J Gen Virol **84**(Pt 4): 1013-1020.

Kirkwood, J. K. and A. A. Cunningham (1994). "Epidemiological observations on spongiform encephalopathies in captive wild animals in the British Isles." Vet Rec **135**(13): 296-303.

Kitamoto, T., T. Muramoto, S. Mohri, K. Doh-Ura and J. Tateishi (1991). "Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jakob disease." *J Virol* **65**(11): 6292-6295.

Klatzo, I., D. C. Gajdusek and V. Zigas (1959). "Pathology of Kuru." *Lab Invest* **8**(4): 799-847.

Kocisko, D. A., J. H. Come, S. A. Priola, B. Chesebro, G. J. Raymond, P. T. Lansbury and B. Caughey (1994). "Cell-free formation of protease-resistant prion protein." *Nature* **370**(6489): 471-474.

Kocisko, D. A., S. A. Priola, G. J. Raymond, B. Chesebro, P. T. Lansbury, Jr. and B. Caughey (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**(9): 3923-3927.

Kong, Q., S. Huang, W. Zou, D. Vanegas, M. Wang, D. Wu, J. Yuan, M. Zheng, H. Bai, H. Deng, K. Chen, A. L. Jenny, K. O'Rourke, E. D. Belay, L. B. Schonberger, R. B. Petersen, M. S. Sy, S. G. Chen and P. Gambetti (2005). "Chronic wasting disease of elk: transmissibility to humans examined by transgenic mouse models." *J Neurosci* **25**(35): 7944-7949.

Kraus, A., B. R. Groveman and B. Caughey (2013). "Prions and the potential transmissibility of protein misfolding diseases." *Annu Rev Microbiol* **67**: 543-564.

Kupfer, L., M. Eiden, A. Buschmann and M. H. Groschup (2007). "Amino acid sequence and prion strain specific effects on the in vitro and in vivo convertibility of ovine/murine and bovine/murine prion protein chimeras." *Biochim Biophys Acta* **1772**(6): 704-713.

Kurt, T. D., L. Jiang, C. Bett, D. Eisenberg and C. J. Sigurdson (2014). "A proposed mechanism for the promotion of prion conversion involving a strictly conserved tyrosine residue in the beta2-alpha2 loop of PrPC." *J Biol Chem* **289**(15): 10660-10667.

Kurt, T. D., L. Jiang, N. Fernandez-Borges, C. Bett, J. Liu, T. Yang, T. R. Spraker, J. Castilla, D. Eisenberg, Q. Kong and C. J. Sigurdson (2015). "Human prion protein sequence elements impede cross-species chronic wasting disease transmission." *J Clin Invest* **125**(4): 1485-1496.

Kurt, T. D., G. C. Telling, M. D. Zabel and E. A. Hoover (2009). "Trans-species amplification of PrP(CWD) and correlation with rigid loop 170N." *Virology* **387**(1): 235-243.

Kyle, L. M., T. R. John, H. M. Schatzl and R. V. Lewis (2013). "Introducing a rigid loop structure from deer into mouse prion protein increases its propensity for misfolding in vitro." *PLoS One* **8**(6): e66715.

Laude, H., D. Vilette, A. Le Dur, F. Archer, S. Soulier, N. Besnard, R. Essalmani and J. L. Vilotte (2002). "New in vivo and ex vivo models for the experimental study of sheep scrapie: development and perspectives." *C R Biol* **325**(1): 49-57.

Lawson, V. A., S. A. Priola, K. Wehrly and B. Chesebro (2001). "N-terminal truncation of prion protein affects both formation and conformation of abnormal protease-resistant prion protein generated in vitro." *J Biol Chem* **276**(38): 35265-35271.

Legname, G., I. V. Baskakov, H. O. Nguyen, D. Riesner, F. E. Cohen, S. J. DeArmond and S. B. Prusiner (2004). "Synthetic mammalian prions." *Science* **305**(5684): 673-676.

Lewis, P. A., F. Properzi, K. Prodromidou, A. R. Clarke, J. Collinge and G. S. Jackson (2006). "Removal of the glycosylphosphatidylinositol anchor from PrP(Sc) by cathepsin D does not reduce prion infectivity." *Biochem J* **395**(2): 443-448.

Liberski, P. P. (2012). "Gerstmann-Straussler-Scheinker disease." *Adv Exp Med Biol* **724**: 128-137.

Liberski, P. P. (2012). "Historical overview of prion diseases: a view from afar." *Folia Neuropathol* **50**(1): 1-12.

Lloyd, S., S. Mead and J. Collinge (2011). "Genetics of prion disease." *Top Curr Chem* **305**: 1-22.

Lowenstein, D. H., D. A. Butler, D. Westaway, M. P. McKinley, S. J. DeArmond and S. B. Prusiner (1990). "Three hamster species with different scrapie incubation times and neuropathological features encode distinct prion proteins." *Mol Cell Biol* **10**(3): 1153-1163.

Luers, L., O. Bannach, J. Stohr, M. M. Wordehoff, M. Wolff, L. Nagel-Steger, D. Riesner, D. Willbold and E. Birkmann (2013). "Seeded fibrillation as molecular basis of the species barrier in human prion diseases." *PLoS One* **8**(8): e72623.

Maddox, R. A., E. D. Belay, A. T. Curns, W. Q. Zou, S. Nowicki, R. G. Lembach, M. D. Geschwind, A. Haman, N. Shinzaki, Y. Nakamura, M. J. Borer and L. B. Schonberger (2008). "Creutzfeldt-Jakob disease in recipients of corneal transplants." *Cornea* **27**(7): 851-854.

Magnusson, K., R. Simon, D. Sjölander, C. Sigurdson, P. Hammarström and K. Nilsson (2014). "Multimodal fluorescence microscopy of prion strain specific PrP deposits stained by thiophene-based amyloid ligands." *Prion* **8**(4): 319-329.

Mahal, S. P., C. A. Baker, C. A. Demczyk, E. W. Smith, C. Julius and C. Weissmann (2007). "Prion strain discrimination in cell culture: the cell panel assay." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(52): 20908-20913.

Makarava, N., G. G. Kovacs, O. Bocharova, R. Savtchenko, I. Alexeeva, H. Budka, R. G. Rohwer and I. V. Baskakov (2010). "Recombinant prion protein induces a new transmissible prion disease in wild-type animals." *Acta Neuropathol* **119**(2): 177-187.

Mallucci, G., A. Dickinson, J. Linehan, P. C. Klohn, S. Brandner and J. Collinge (2003). "Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis." *Science* **302**(5646): 871-874.

Mallucci, G. R., M. D. White, M. Farmer, A. Dickinson, H. Khatun, A. D. Powell, S. Brandner, J. G. Jefferys and J. Collinge (2007). "Targeting cellular prion protein reverses early cognitive deficits and neurophysiological dysfunction in prion-infected mice." *Neuron* **53**(3): 325-335.

Marsh, R. F. and W. J. Hadlow (1992). "Transmissible mink encephalopathy." *Rev Sci Tech* **11**(2): 539-550.

Masel, J. and V. A. Jansen (2001). "The measured level of prion infectivity varies in a predictable way according to the aggregation state of the infectious agent." *Biochim Biophys Acta* **1535**(2): 164-173.

Masel, J., V. A. Jansen and M. A. Nowak (1999). "Quantifying the kinetic parameters of prion replication." *Biophys Chem* **77**(2-3): 139-152.

McKinley, M. P., D. C. Bolton and S. B. Prusiner (1983). "A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion." *Cell* **35**(1): 57-62.

McKinley, M. P., M. B. Braunfeld, C. G. Bellinger and S. B. Prusiner (1986). "Molecular characteristics of prion rods purified from scrapie-infected hamster brains." *J Infect Dis* **154**(1): 110-120.

McKinley, M. P. and S. B. Prusiner (1991). "Ultrastructural studies of prions." *Curr Top Microbiol Immunol* **172**: 75-91.

Meier, P., N. Genoud, M. Prinz, M. Maissen, T. Rulicke, A. Zurbriggen, A. J. Raeber and A. Aguzzi (2003). "Soluble dimeric prion protein binds PrP(Sc) in vivo and antagonizes prion disease." *Cell* **113**(1): 49-60.

Merz, P. A., R. A. Somerville, H. M. Wisniewski and K. Iqbal (1981). "Abnormal fibrils from scrapie-infected brain." *Acta Neuropathol* **54**(1): 63-74.

Merz, P. A., R. A. Somerville, H. M. Wisniewski, L. Manuelidis and E. E. Manuelidis (1983). "Scrapie-associated fibrils in Creutzfeldt-Jakob disease." *Nature* **306**(5942): 474-476.

Meyer, R. K., M. P. McKinley, K. A. Bowman, M. B. Braunfeld, R. A. Barry and S. B. Prusiner (1986). "Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(8): 2310-2314.

Moore, R. A., I. Vorberg and S. A. Priola (2005). "Species barriers in prion diseases--brief review." Arch Virol Suppl(19): 187-202.

Moore, R. C., J. Hope, P. A. McBride, I. McConnell, J. Selfridge, D. W. Melton and J. C. Manson (1998). "Mice with gene targeted prion protein alterations show that Prnp, Sinc and Prni are congruent." Nat Genet **18**(2): 118-125.

Moore, R. C., N. J. Redhead, J. Selfridge, J. Hope, J. C. Manson and D. W. Melton (1995). "Double replacement gene targeting for the production of a series of mouse strains with different prion protein gene alterations." Biotechnology (N Y) **13**(9): 999-1004.

Moroncini, G., N. Kanu, L. Solfrosi, G. Abalos, G. C. Telling, M. Head, J. Ironside, J. P. Brockes, D. R. Burton and R. A. Williamson (2004). "Motif-grafted antibodies containing the replicative interface of cellular PrP are specific for PrPSc." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(28): 10404-10409.

Nazor, K. E., F. Kuhn, T. Seward, M. Green, D. Zwald, M. Purro, J. Schmid, K. Biffiger, A. M. Power, B. Oesch, A. J. Raeber and G. C. Telling (2005). "Immunodetection of disease-associated mutant PrP, which accelerates disease in GSS transgenic mice." EMBO J **24**(13): 2472-2480.

Nelson, R., M. R. Sawaya, M. Balbirnie, A. O. Madsen, C. Riek, R. Grothe and D. Eisenberg (2005). "Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils." Nature **435**(7043): 773-778.

Nicolas, O., R. Gavin and J. A. del Rio (2009). "New insights into cellular prion protein (PrPc) functions: the "ying and yang" of a relevant protein." Brain Res Rev **61**(2): 170-184.

Nishina, K. A., N. R. Deleault, S. P. Mahal, I. Baskakov, T. Luhrs, R. Riek and S. Supattapone (2006). "The stoichiometry of host PrPC glycoforms modulates the efficiency of PrPSc formation in vitro." Biochemistry **45**(47): 14129-14139.

Noble, G. P., D. W. Wang, D. J. Walsh, J. R. Barone, M. B. Miller, K. A. Nishina, S. Li and S. Supattapone (2015). "A Structural and Functional Comparison Between Infectious and Non-Infectious Autocatalytic Recombinant PrP Conformers." PLoS Pathog **11**(6): e1005017.

Oesch, B., D. Westaway, M. Walchli, M. P. McKinley, S. B. Kent, R. Aebersold, R. A. Barry, P. Tempst, D. B. Teplow, L. E. Hood and et al. (1985). "A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein." Cell **40**(4): 735-746.

Padilla, D., V. Beringue, J. C. Espinosa, O. Andreoletti, E. Jaumain, F. Reine, L. Herzog, A. Gutierrez-Adan, B. Pintado, H. Laude and J. M. Torres (2011). "Sheep and goat BSE propagate more efficiently than cattle BSE in human PrP transgenic mice." PLoS Pathog **7**(3): e1001319.

Pan, K. M., M. Baldwin, J. Nguyen, M. Gasset, A. Serban, D. Groth, I. Mehlhorn, Z. Huang, R. J. Fletterick, F. E. Cohen and et al. (1993). "Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(23): 10962-10966.

Panza, G., L. Luers, J. Stohr, L. Nagel-Steger, J. Weiss, D. Riesner, D. Willbold and E. Birkmann (2010). "Molecular interactions between prions as seeds and recombinant prion proteins as substrates resemble the biological interspecies barrier in vitro." PLoS One **5**(12): e14283.

Papasavva-Stylianou, P., M. Kleanthous, P. Toumazos, P. Mavrikiou and P. Loucaides (2007). "Novel polymorphisms at codons 146 and 151 in the prion protein gene of Cyprus goats, and their association with natural scrapie." Vet J **173**(2): 459-462.

Paramithiotis, E., M. Pinard, T. Lawton, S. LaBoissiere, V. L. Leathers, W. Q. Zou, L. A. Estey, J. Lamontagne, M. T. Lehto, L. H. Kondejewski, G. P. Francoeur, M. Papadopoulos, A. Haghghat, S. J. Spatz, M. Head, R. Will, J. Ironside, K. O'Rourke, Q. Tonelli, H. C. Ledebur, A. Chakrabartty and N. R. Cashman (2003). "A prion protein epitope selective for the pathologically misfolded conformation." Nat Med **9**(7): 893-899.

Parchi, P., R. Castellani, S. Capellari, B. Ghetti, K. Young, S. G. Chen, M. Farlow, D. W. Dickson, A. A. Sima, J. Q. Trojanowski, R. B. Petersen and P. Gambetti (1996). "Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease." Ann Neurol **39**(6): 767-778.

Parchi, P., S. G. Chen, P. Brown, W. Zou, S. Capellari, H. Budka, J. Hainfellner, P. F. Reyes, G. T. Golden, J. J. Hauw, D. C. Gajdusek and P. Gambetti (1998). "Different patterns of truncated prion protein fragments correlate with distinct phenotypes in P102L Gerstmann-Straussler-Scheinker disease." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(14): 8322-8327.

Pattison, I. H. (1965). "Resistance of the Scrapie Agent to Formalin." J Comp Pathol **75**: 159-164.

Pattison, I. H. and G. C. Millson (1962). "Distribution of the scrapie agent in the tissues of experimentally inoculated goats." J Comp Pathol **72**: 233-244.

Pattison, J. (1998). "The emergence of bovine spongiform encephalopathy and related diseases." Emerg Infect Dis **4**(3): 390-394.

Peoc'h, K., P. Manivet, P. Beaudry, F. Attane, G. Besson, D. Hannequin, N. Delasnerie-Lauprêtre and J. Laplanche (2000). "Identification of Three Novel Mutations (E196K, V203I, E211Q) in the Prion Protein Gene (PRNP) in Inherited Prion Diseases with Creutzfeldt-Jakob Disease Phenotype." Hum Mutat **15**(5).

Peretz, D., R. A. Williamson, Y. Matsunaga, H. Serban, C. Pinilla, R. B. Bastidas, R. Rozenshteyn, T. L. James, R. A. Houghten, F. E. Cohen, S. B. Prusiner and D. R. Burton (1997). "A conformational transition at the N terminus of the prion protein features in formation of the scrapie isoform." J Mol Biol **273**(3): 614-622.

Perez, D. R., F. F. Damberger and K. Wuthrich (2010). "Horse prion protein NMR structure and comparisons with related variants of the mouse prion protein." J Mol Biol **400**(2): 121-128.

Pergami, P., H. Jaffe and J. Safar (1996). "Semipreparative chromatographic method to purify the normal cellular isoform of the prion protein in nondenatured form." Anal Biochem **236**(1): 63-73.

Pietrini, V., G. Puoti, L. Limido, G. Rossi, G. Di Fede, G. Giaccone, M. Mangieri, F. Tedeschi, A. Bondavalli, D. Mancina, O. Bugiani and F. Tagliavini (2003). "Creutzfeldt-Jakob disease with a novel extra-repeat insertional mutation in the PRNP gene." Neurology **61**(9): 1288-1291.

Pirisinu, L., R. Nonno, E. Esposito, S. L. Benestad, P. Gambetti, U. Agrimi and W. Q. Zou (2013). "Small ruminant nor98 prions share biochemical features with human gerstmann-straussler-scheinker disease and variably protease-sensitive prionopathy." PLoS One **8**(6): e66405.

Polymenidou, M., H. Trusheim, L. Stallmach, R. Moos, C. Julius, G. Miele, C. Lenz-Bauer and A. Aguzzi (2008). "Canine MDCK cell lines are refractory to infection with human and mouse prions." Vaccine **26**(21): 2601-2614.

Prigent, S. and H. Rezaei (2011). "PrP assemblies: spotting the responsible regions in prion propagation." Prion **5**(2): 69-75.

Prinz, M., M. Heikenwalder, T. Junt, P. Schwarz, M. Glatzel, F. L. Heppner, Y. X. Fu, M. Lipp and A. Aguzzi (2003). "Positioning of follicular dendritic cells within the spleen controls prion neuroinvasion." Nature **425**(6961): 957-962.

Priola, S. A., J. Chabry and K. Chan (2001). "Efficient conversion of normal prion protein (PrP) by abnormal hamster PrP is determined by homology at amino acid residue 155." *J Virol* **75**(10): 4673-4680.

Priola, S. A. and B. Chesebro (1995). "A single hamster PrP amino acid blocks conversion to protease-resistant PrP in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells." *J Virol* **69**(12): 7754-7758.

Prusiner, S. B. (1982). "Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie." *Science* **216**(4542): 136-144.

Prusiner, S. B. (1990). "Novel structure and genetics of prions causing neurodegeneration in humans and animals." *Biologicals* **18**(4): 247-262.

Prusiner, S. B., M. P. McKinley, K. A. Bowman, D. C. Bolton, P. E. Bendheim, D. F. Groth and G. G. Glenner (1983). "Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods." *Cell* **35**(2 Pt 1): 349-358.

Prusiner, S. B., M. Scott, D. Foster, K. M. Pan, D. Groth, C. Mirenda, M. Torchia, S. L. Yang, D. Serban, G. A. Carlson and et al. (1990). "Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication." *Cell* **63**(4): 673-686.

Prusiner, S. B., M. R. Scott, S. J. DeArmond and F. E. Cohen (1998). "Prion protein biology." *Cell* **93**(3): 337-348.

Puig, B., H. Altmepfen and M. Glatzel (2014). "The GPI-anchoring of PrP." *Prion* **8**(1): 11-18.

Race, B., K. D. Meade-White, M. W. Miller, K. D. Barbican, R. Rubenstein, G. LaFauci, L. Cervenakova, C. Favara, D. Gardner, D. Long, M. Parnell, J. Striebel, S. A. Priola, A. Ward, E. S. Williams, R. Race and B. Chesebro (2009). "Susceptibilities of nonhuman primates to chronic wasting disease." *Emerg Infect Dis* **15**(9): 1366-1376.

Race, B., K. D. Meade-White, K. Phillips, J. Striebel, R. Race and B. Chesebro (2014). "Chronic wasting disease agents in nonhuman primates." *Emerg Infect Dis* **20**(5): 833-837.

Race, R., K. Meade-White, A. Raines, G. J. Raymond, B. Caughey and B. Chesebro (2002). "Subclinical scrapie infection in a resistant species: persistence, replication, and adaptation of infectivity during four passages." *J Infect Dis* **186 Suppl 2**: S166-170.

Race, R. E., S. A. Priola, R. A. Bessen, D. Ernst, J. Dockter, G. F. Rall, L. Mucke, B. Chesebro and M. B. Oldstone (1995). "Neuron-specific expression of a hamster prion protein minigene in transgenic mice induces susceptibility to hamster scrapie agent." *Neuron* **15**(5): 1183-1191.

Raymond, G. J., A. Bossers, L. D. Raymond, K. I. O'Rourke, L. E. McHolland, P. K. Bryant, 3rd, M. W. Miller, E. S. Williams, M. Smits and B. Caughey (2000). "Evidence of a molecular barrier limiting susceptibility of humans, cattle and sheep to chronic wasting disease." *EMBO J* **19**(17): 4425-4430.

Richt, J. A., P. Kasinathan, A. N. Hamir, J. Castilla, T. Sathiyaseelan, F. Vargas, J. Sathiyaseelan, H. Wu, H. Matsushita, J. Koster, S. Kato, I. Ishida, C. Soto, J. M. Robl and Y. Kuroiwa (2007). "Production of cattle lacking prion protein." *Nat Biotechnol* **25**(1): 132-138.

Riek, R., S. Hornemann, G. Wider, M. Billeter, R. Glockshuber and K. Wuthrich (1996). "NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231)." *Nature* **382**(6587): 180-182.

Riek, R., S. Hornemann, G. Wider, R. Glockshuber and K. Wuthrich (1997). "NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231)." *FEBS Lett* **413**(2): 282-288.

Rigter, A., J. P. Langeveld, D. Timmers-Parohi, J. G. Jacobs, P. L. Moonen and A. Bossers (2007). "Mapping of possible prion protein self-interaction domains using peptide arrays." *BMC Biochem* **8**: 6.

Rivillas-Acevedo, L., R. Grande-Aztatzi, I. Lomeli, J. E. Garcia, E. Barrios, S. Teloxa, A. Vela and L. Quintanar (2011). "Spectroscopic and electronic structure studies of copper(II) binding to His111 in the

human prion protein fragment 106-115: evaluating the role of protons and methionine residues." *Inorg Chem* **50**(5): 1956-1972.

Rogers, M., F. Yehiely, M. Scott and S. B. Prusiner (1993). "Conversion of truncated and elongated prion proteins into the scrapie isoform in cultured cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(8): 3182-3186.

Ryou, C. and C. E. Mays (2008). "Prion propagation in vitro: are we there yet?" *Int J Med Sci* **5**(6): 347-353.

Saa, P., J. Castilla and C. Soto (2005). "Cyclic amplification of protein misfolding and aggregation." *Methods Mol Biol* **299**: 53-65.

Saa, P., J. Castilla and C. Soto (2006). "Presymptomatic detection of prions in blood." *Science* **313**(5783): 92-94.

Saa, P., J. Castilla and C. Soto (2006). "Ultra-efficient replication of infectious prions by automated protein misfolding cyclic amplification." *J Biol Chem* **281**(46): 35245-35252.

Saa, P., G. F. Sferrazza, G. Ottenberg, A. M. Oelschlegel, K. Dorsey and C. I. Lasmezas (2012). "Strain-specific role of RNAs in prion replication." *J Virol* **86**(19): 10494-10504.

Saborio, G. P., B. Permanne and C. Soto (2001). "Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding." *Nature* **411**(6839): 810-813.

Safar, J., P. P. Roller, D. C. Gajdusek and C. J. Gibbs, Jr. (1993). "Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein." *J Biol Chem* **268**(27): 20276-20284.

Safar, J., P. P. Roller, D. C. Gajdusek and C. J. Gibbs, Jr. (1993). "Thermal stability and conformational transitions of scrapie amyloid (prion) protein correlate with infectivity." *Protein Sci* **2**(12): 2206-2216.

Sakudo, A., I. Nakamura, K. Ikuta and T. Onodera (2007). "Recent developments in prion disease research: diagnostic tools and in vitro cell culture models." *J Vet Med Sci* **69**(4): 329-337.

Sanchez-Valle, R., J. Yague, A. Turon, J. I. Arostegui, C. Nos, M. J. Rey, I. Ferrer and E. Gelpi (2012). "Inherited prion disease with 4-octapeptide repeat insertion linked to valine at codon 129." *Brain* **135**(Pt 4): e212.

Sarradin, P., C. Viglietta, C. Limouzin, O. Andreoletti, N. Daniel-Carlier, C. Barc, M. Leroux-Coyau, P. Berthon, J. Chapuis, C. Rossignol, J. L. Gatti, M. Belghazi, V. Labas, J. L. Vilotte, V. Beringue, F. Lantier, H. Laude and L. M. Houdebine (2015). "Transgenic Rabbits Expressing Ovine PrP Are Susceptible to Scrapie." *PLoS Pathog* **11**(8): e1005077.

Saunders, S. E., S. L. Bartelt-Hunt and J. C. Bartz (2012). "Occurrence, transmission, and zoonotic potential of chronic wasting disease." *Emerg Infect Dis* **18**(3): 369-376.

Schuler, B., R. Rachel and R. Seckler (1999). "Formation of fibrous aggregates from a non-native intermediate: the isolated P22 tailspike beta-helix domain." *J Biol Chem* **274**(26): 18589-18596.

Scott, M., D. Foster, C. Mirenda, D. Serban, F. Coufal, M. Walchli, M. Torchia, D. Groth, G. Carlson, S. J. DeArmond, D. Westaway and S. B. Prusiner (1989). "Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques." *Cell* **59**(5): 847-857.

Scott, M., D. Groth, D. Foster, M. Torchia, S. L. Yang, S. J. DeArmond and S. B. Prusiner (1993). "Propagation of prions with artificial properties in transgenic mice expressing chimeric PrP genes." *Cell* **73**(5): 979-988.

Scott, M. R., J. Safar, G. Telling, O. Nguyen, D. Groth, M. Torchia, R. Koehler, P. Tremblay, D. Walther, F. E. Cohen, S. J. DeArmond and S. B. Prusiner (1997). "Identification of a prion protein epitope modulating

transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(26): 14279-14284.

Serag, A. A., C. Altenbach, M. Gingery, W. L. Hubbell and T. O. Yeates (2002). "Arrangement of subunits and ordering of beta-strands in an amyloid sheet." Nat Struct Biol **9**(10): 734-739.

Shlomchik, M. J., K. Radebold, N. Duclos and L. Manuelidis (2001). "Neuroinvasion by a Creutzfeldt-Jakob disease agent in the absence of B cells and follicular dendritic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(16): 9289-9294.

Si, K., S. Lindquist and E. R. Kandel (2003). "A neuronal isoform of the aplysia CPEB has prion-like properties." Cell **115**(7): 879-891.

Sigurdson, C. J., G. Manco, P. Schwarz, P. Liberski, E. A. Hoover, S. Hornemann, M. Polymenidou, M. W. Miller, M. Glatzel and A. Aguzzi (2006). "Strain fidelity of chronic wasting disease upon murine adaptation." J Virol **80**(24): 12303-12311.

Sigurdson, C. J. and M. W. Miller (2003). "Other animal prion diseases." Br Med Bull **66**: 199-212.

Sigurdson, C. J., K. P. Nilsson, S. Hornemann, G. Manco, N. Fernandez-Borges, P. Schwarz, J. Castilla, K. Wuthrich and A. Aguzzi (2010). "A molecular switch controls interspecies prion disease transmission in mice." J Clin Invest **120**(7): 2590-2599.

Silva, C. J., E. Vazquez-Fernandez, B. Onisko and J. R. Requena (2015). "Proteinase K and the structure of PrP^{Sc}: The good, the bad and the ugly." Virus Res **207**: 120-126.

Silveira, J. R., G. J. Raymond, A. G. Hughson, R. E. Race, V. L. Sim, S. F. Hayes and B. Caughey (2005). "The most infectious prion protein particles." Nature **437**(7056): 257-261.

Sim, V. L. and B. Caughey (2009). "Ultrastructures and strain comparison of under-glycosylated scrapie prion fibrils." Neurobiol Aging **30**(12): 2031-2042.

Simoneau, S., H. Rezaei, N. Sales, G. Kaiser-Schulz, M. Lefebvre-Roque, C. Vidal, J. G. Fournier, J. Comte, F. Wopfner, J. Grosclaude, H. Schatzl and C. I. Lasmezas (2007). "In vitro and in vivo neurotoxicity of prion protein oligomers." PLoS Pathog **3**(8): e125.

Smirnovas, V., G. S. Baron, D. K. Offerdahl, G. J. Raymond, B. Caughey and W. K. Surewicz (2011). "Structural organization of brain-derived mammalian prions examined by hydrogen-deuterium exchange." Nat Struct Mol Biol **18**(4): 504-506.

Sokolowski, F., A. J. Modler, R. Masuch, D. Zirwer, M. Baier, G. Lutsch, D. A. Moss, K. Gast and D. Naumann (2003). "Formation of critical oligomers is a key event during conformational transition of recombinant syrian hamster prion protein." J Biol Chem **278**(42): 40481-40492.

Solfrosi, L., M. Milani, N. Mancini, M. Clementi and R. Burioni (2013). "A closer look at prion strains: characterization and important implications." Prion **7**(2): 99-108.

Soto, C. (2011). "Prion hypothesis: the end of the controversy?" Trends Biochem Sci **36**(3): 151-158.

Soto, C., G. P. Saborio and L. Anderes (2002). "Cyclic amplification of protein misfolding: application to prion-related disorders and beyond." Trends Neurosci **25**(8): 390-394.

Soto, C. and N. Satani (2011). "The intricate mechanisms of neurodegeneration in prion diseases." Trends Mol Med **17**(1): 14-24.

Stahl, N., M. A. Baldwin, D. B. Teplow, L. Hood, B. W. Gibson, A. L. Burlingame and S. B. Prusiner (1993). "Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing." Biochemistry **32**(8): 1991-2002.

Supattapone, S., T. Muramoto, G. Legname, I. Mehlhorn, F. E. Cohen, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner and M. R. Scott (2001). "Identification of two prion protein regions that modify scrapie incubation time." *J Virol* **75**(3): 1408-1413.

Sweeting, B., E. Brown, M. Q. Khan, A. Chakrabarty and E. F. Pai (2013). "N-terminal helix-cap in alpha-helix 2 modulates beta-state misfolding in rabbit and hamster prion proteins." *PLoS One* **8**(5): e63047.

Tagliavini, F., P. M. Lievens, C. Tranchant, J. M. Warter, M. Mohr, G. Giaccone, F. Perini, G. Rossi, M. Salmona, P. Piccardo, B. Ghetti, R. C. Beavis, O. Bugiani, B. Frangione and F. Prelli (2001). "A 7-kDa prion protein (PrP) fragment, an integral component of the PrP region required for infectivity, is the major amyloid protein in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease A117V." *J Biol Chem* **276**(8): 6009-6015.

Tamguney, G., J. A. Richt, A. N. Hamir, J. J. Greenlee, M. W. Miller, L. L. Wolfe, T. M. Sirochman, A. J. Young, D. V. Glidden, N. L. Johnson, K. Giles, S. J. DeArmond and S. B. Prusiner (2012). "Salivary prions in sheep and deer." *Prion* **6**(1): 52-61.

Telling, G. C., M. Scott, J. Mastrianni, R. Gabizon, M. Torchia, F. E. Cohen, S. J. DeArmond and S. B. Prusiner (1995). "Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein." *Cell* **83**(1): 79-90.

Timmes, A. G., R. A. Moore, E. R. Fischer and S. A. Priola (2013). "Recombinant prion protein refolded with lipid and RNA has the biochemical hallmarks of a prion but lacks in vivo infectivity." *PLoS One* **8**(7): e71081.

Tixador, P., L. Herzog, F. Reine, E. Jaumain, J. Chapuis, A. Le Dur, H. Laude and V. Beringue (2010). "The physical relationship between infectivity and prion protein aggregates is strain-dependent." *PLoS Pathog* **6**(4): e1000859.

Torres, J. M., J. Castilla, B. Pintado, A. Gutierrez-Adan, O. Andreoletti, P. Aguilar-Calvo, A. I. Arroba, B. Parra-Arrondo, I. Ferrer, J. Manzanares and J. C. Espinosa (2013). "Spontaneous generation of infectious prion disease in transgenic mice." *Emerg Infect Dis* **19**(12): 1938-1947.

Truscott, J. E. and N. M. Ferguson (2009). "Transmission dynamics and mechanisms of endemicity of scrapie in the UK sheep population." *Epidemiol Infect* **137**(6): 762-774.

Vaccari, G., C. D'Agostino, R. Nonno, F. Rosone, M. Conte, M. A. Di Bari, B. Chiappini, E. Esposito, L. De Grossi, F. Giordani, S. Marcon, L. Morelli, R. Borroni and U. Agrimi (2007). "Prion protein alleles showing a protective effect on the susceptibility of sheep to scrapie and bovine spongiform encephalopathy." *J Virol* **81**(13): 7306-7309.

Vaccari, G., M. A. Di Bari, L. Morelli, R. Nonno, B. Chiappini, G. Antonucci, S. Marcon, E. Esposito, P. Fazzi, N. Palazzini, P. Troiano, A. Petrella, G. Di Guardo and U. Agrimi (2006). "Identification of an allelic variant of the goat PrP gene associated with resistance to scrapie." *J Gen Virol* **87**(Pt 5): 1395-1402.

Vidal, E., N. Fernandez-Borges, B. Pintado, H. Erana, M. Ordonez, M. Marquez, F. Chianini, D. Fondevila, M. A. Sanchez-Martin, O. Andreoletti, M. P. Dagleish, M. Pumarola and J. Castilla (2015). "Transgenic Mouse Bioassay: Evidence That Rabbits Are Susceptible to a Variety of Prion Isolates." *PLoS Pathog* **11**(8): e1004977.

Vilotte, J. L., S. Soulier, R. Essalmani, M. G. Stinnakre, D. Vaiman, L. Lepourry, J. C. Da Silva, N. Besnard, M. Dawson, A. Buschmann, M. Groschup, S. Petit, M. F. Madelaine, S. Rakatobe, A. Le Dur, D. Vilette and H. Laude (2001). "Markedly increased susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice expressing ovine prp." *J Virol* **75**(13): 5977-5984.

Vital, A., J. L. Laplanche, J. R. Bastard, X. Xiao, W. Q. Zou and C. Vital (2011). "A case of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease with a novel six octapeptide repeat insertion." Neuropathol Appl Neurobiol **37**(5): 554-559.

Vorberg, I., M. H. Groschup, E. Pfaff and S. A. Priola (2003). "Multiple amino acid residues within the rabbit prion protein inhibit formation of its abnormal isoform." J Virol **77**(3): 2003-2009.

Walsh, D., I. Klyubin, J. Fadeeva, M. Rowan and D. Selkoe (2002). "Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition." Biochem Soc Trans **30**(4): 552-557.

Wang, F., X. Wang and J. Ma (2011). "Conversion of bacterially expressed recombinant prion protein." Methods **53**(3): 208-213.

Wang, F., X. Wang, C. G. Yuan and J. Ma (2010). "Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein." Science **327**(5969): 1132-1135.

Wasmer, C., A. Lange, H. Van Melckebeke, A. B. Siemer, R. Riek and B. H. Meier (2008). "Amyloid fibrils of the HET-s(218-289) prion form a beta solenoid with a triangular hydrophobic core." Science **319**(5869): 1523-1526.

Wathne, G. J. and N. A. Mabbott (2012). "The diverse roles of mononuclear phagocytes in prion disease pathogenesis." Prion **6**(2): 124-133.

Watts, J. C., K. Giles, J. Stohr, A. Oehler, S. Bhardwaj, S. K. Grillo, S. Patel, S. J. DeArmond and S. B. Prusiner (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**(9): 3498-3503.

Watts, J. C. and S. B. Prusiner (2014). "Mouse models for studying the formation and propagation of prions." J Biol Chem **289**(29): 19841-19849.

Weissmann, C. and A. Aguzzi (1997). "Bovine spongiform encephalopathy and early onset variant Creutzfeldt-Jakob disease." Curr Opin Neurobiol **7**(5): 695-700.

Weissmann, C., J. Li, S. P. Mahal and S. Browning (2011). "Prions on the move." EMBO Rep **12**(11): 1109-1117.

Wen, Y., J. Li, M. Xiong, Y. Peng, W. Yao, J. Hong and D. Lin (2010). "Solution structure and dynamics of the I214V mutant of the rabbit prion protein." PLoS One **5**(10): e13273.

Wen, Y., J. Li, W. Yao, M. Xiong, J. Hong, Y. Peng, G. Xiao and D. Lin (2010). "Unique structural characteristics of the rabbit prion protein." J Biol Chem **285**(41): 31682-31693.

Westaway, D., P. A. Goodman, C. A. Mirenda, M. P. McKinley, G. A. Carlson and S. B. Prusiner (1987). "Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice." Cell **51**(4): 651-662.

Westaway, D., V. Zuliani, C. M. Cooper, M. Da Costa, S. Neuman, A. L. Jenny, L. Detwiler and S. B. Prusiner (1994). "Homozygosity for prion protein alleles encoding glutamine-171 renders sheep susceptible to natural scrapie." Genes Dev **8**(8): 959-969.

Westergard, L., H. M. Christensen and D. A. Harris (2007). "The cellular prion protein (PrP(C)): its physiological function and role in disease." Biochim Biophys Acta **1772**(6): 629-644.

Wickner, R. B., F. P. Shewmaker, D. A. Bateman, H. K. Edskes, A. Gorkovskiy, Y. Dayani and E. E. Bezonov (2015). "Yeast prions: structure, biology, and prion-handling systems." Microbiol Mol Biol Rev **79**(1): 1-17.

Wille, H., W. Bian, M. McDonald, A. Kendall, D. W. Colby, L. Bloch, J. Ollesch, A. L. Borovinskiy, F. E. Cohen, S. B. Prusiner and G. Stubbs (2009). "Natural and synthetic prion structure from X-ray fiber diffraction." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(40): 16990-16995.

Wille, H., G. F. Zhang, M. A. Baldwin, F. E. Cohen and S. B. Prusiner (1996). "Separation of scrapie prion infectivity from PrP amyloid polymers." *J Mol Biol* **259**(4): 608-621.

Williamson, R. A., D. Peretz, C. Pinilla, H. Ball, R. B. Bastidas, R. Rozenshteyn, R. A. Houghten, S. B. Prusiner and D. R. Burton (1998). "Mapping the prion protein using recombinant antibodies." *J Virol* **72**(11): 9413-9418.

Wiltzius, J. J., S. A. Sievers, M. R. Sawaya, D. Cascio, D. Popov, C. Riek and D. Eisenberg (2008). "Atomic structure of the cross-beta spine of islet amyloid polypeptide (amylin)." *Protein Sci* **17**(9): 1467-1474.

Windl, O., M. Buchholz, A. Neubauer, W. Schulz-Schaeffer, M. Groschup, S. Walter, S. Arendt, M. Neumann, A. K. Voss and H. A. Kretzschmar (2005). "Breaking an absolute species barrier: transgenic mice expressing the mink PrP gene are susceptible to transmissible mink encephalopathy." *J Virol* **79**(23): 14971-14975.

Wopfner, F., G. Weidenhofer, R. Schneider, A. von Brunn, S. Gilch, T. F. Schwarz, T. Werner and H. M. Schatzl (1999). "Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein." *J Mol Biol* **289**(5): 1163-1178.

Yam, A. Y., C. M. Gao, X. Wang, P. Wu and D. Peretz (2010). "The octarepeat region of the prion protein is conformationally altered in PrP(Sc)." *PLoS One* **5**(2): e9316.

Yan, X., J. J. Huang, Z. Zhou, J. Chen and Y. Liang (2014). "How does domain replacement affect fibril formation of the rabbit/human prion proteins." *PLoS One* **9**(11): e113238.

Yuan, J., Y. A. Zhan, R. Abskharon, X. Xiao, M. C. Martinez, X. Zhou, G. Kneale, J. Mikol, S. Lehmann, W. K. Surewicz, J. Castilla, J. Steyaert, S. Zhang, Q. Kong, R. B. Petersen, A. Wohlkonig and W. Q. Zou (2013). "Recombinant human prion protein inhibits prion propagation in vitro." *Sci Rep* **3**: 2911.

Yuan, Z., L. Yang, B. Chen, T. Zhu, M. F. Hassan, X. Yin, X. Zhou and D. Zhao (2015). "Protein misfolding cyclic amplification induces the conversion of recombinant prion protein to PrP oligomers causing neuronal apoptosis." *J Neurochem* **133**(5): 722-729.

Zahn, R. (2003). "The octapeptide repeats in mammalian prion protein constitute a pH-dependent folding and aggregation site." *J Mol Biol* **334**(3): 477-488.

Zhang, H., J. Stockel, I. Mehlhorn, D. Groth, M. A. Baldwin, S. B. Prusiner, T. L. James and F. E. Cohen (1997). "Physical studies of conformational plasticity in a recombinant prion protein." *Biochemistry* **36**(12): 3543-3553.

Zhang, J. (2009). "Studies on the structural stability of rabbit prion probed by molecular dynamics simulations." *J Biomol Struct Dyn* **27**(2): 159-162.

Zhang, J. (2010). "Studies on the structural stability of rabbit prion probed by molecular dynamics simulations of its wild-type and mutants." *J Theor Biol* **264**(1): 119-122.

Zhang, J. (2011). "Comparison studies of the structural stability of rabbit prion protein with human and mouse prion proteins." *J Theor Biol* **269**(1): 88-95.

Zhang, J. (2011). "The nature of the infectious agents: PrP models of resistant species to prion diseases (dog, rabbit and horses)." *Prions and Prion Diseases: New Developments*.

Zhang, J. and D. D. Liu (2011). "Molecular dynamics studies on the structural stability of wild-type dog prion protein." *J Biomol Struct Dyn* **28**(6): 861-869.

Zhang, J. and Y. Zhang (2014). "Molecular dynamics studies on the NMR and X-ray structures of rabbit prion proteins." *J Theor Biol* **342**: 70-82.

Zhang, S. and A. Rich (1997). "Direct conversion of an oligopeptide from a beta-sheet to an alpha-helix: a model for amyloid formation." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(1): 23-28.

Zou, W. Q., G. Puoti, X. Xiao, J. Yuan, L. Qing, I. Cali, M. Shimoji, J. P. Langeveld, R. Castellani, S. Notari, B. Crain, R. E. Schmidt, M. Geschwind, S. J. Dearmond, N. J. Cairns, D. Dickson, L. Honig, J. M. Torres, J. Mastrianni, S. Capellari, G. Giaccone, E. D. Belay, L. B. Schonberger, M. Cohen, G. Perry, Q. Kong, P. Parchi, F. Tagliavini and P. Gambetti (2010). "Variably protease-sensitive prionopathy: a new sporadic disease of the prion protein." Ann Neurol **68**(2): 162-172.