

Adaptación de un sistema de propagación de priones *in vitro* para el cribado masivo de compuestos específicos frente a las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles humanas

EZEQUIEL GONZÁLEZ MIRANDA

LEIOA, 2020

Tesis Doctoral:

**Adaptación de un sistema de propagación de
priones *in vitro* para el cribado masivo de
compuestos específicos frente a las
Encefalopatías Espongiformes Transmisibles
humanas**

EZEQUIEL GONZÁLEZ MIRANDA

LEIOA, 2020

DIRECTORES:

Dr. Joaquín Castilla Castrillón

Dra. María V. Geijo Vázquez

TUTOR:

Dr. Carlos Matute Almu

TESI ZUZENDARIAREN BAIMENA TESIA AURKEZTEKO	AUTORIZACIÓN DEL/LA DIRECTORA/A DE TESIS PARA SU PRESENTACIÓN
--	--

Zuzendariaren izen-abizenak /Nombre y apellidos del/la director/a: **Joaquín Castilla Castrillón**
con IFZ /NIF: **16287336R**

y Zuzendariaren izen-abizenak /Nombre y apellidos del/la director/a: **María V. Geijo Vázquez**
con IFZ /NIF: **30636732L**

Tesiaren izenburua / Título de la tesis: **Adaptación de un sistema de propagación de priones *in vitro* para el cribado masivo de compuestos específicos frente a las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles humanas**

Doktorego programa / Programa de doctorado: **Neurociencias**

Doktoregaiaren izen-abizenak / Nombre y apellidos del/la doctorando/a: **Ezequiel González Miranda**

Unibertsitateak horretarako jartzen duen tresnak emandako ANTZEKOTASUN TXOSTENA ikusita, baimena ematen dut goian aipatzen den tesia aurkez dadin, horretarako baldintza guztiak betetzen baititu.

Visto el INFORME DE SIMILITUD obtenido de la herramienta que a tal efecto pone a disposición la universidad, autorizo la presentación de la tesis doctoral arriba indicada, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Tokia eta data / Lugar y fecha: **En DERIO a 18 de junio de 2020**

Sin. / Fdo.: Tesiaren zuzendaria / El/La director/a de la tesis



Fdo.: **Joaquín Castilla Castrillón**



Fdo.: **María V. Geijo Vázquez**

AUTORIZACION DEL TUTOR/A DE TESIS

PARA SU PRESENTACION

Dr/a. **Carlos Matute Almu**

como Tutor/a de la Tesis Doctoral: **Adaptación de un sistema de propagación de priones *in vitro* para el cribado masivo de compuestos específicos frente a las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles humanas**

realizada en el Programa de Doctorado **Neurociencias**

por el Doctorando Don/ña. **Ezequiel González Miranda**

y dirigida por el Dr./a **Joaquín Castilla Castrillón y María V. Geijo Vázquez**

autorizo la presentación de la citada Tesis Doctoral, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

En **LEIOA** a **22** de **JUNIO** de **2020**

EL/LA TUTOR/A DE LA TESIS

Debido a que es una firma digital se adjunta aparte el documento debidamente cumplimentado y firmado

Fdo.: **Carlos Matute Almu**

AUTORIZACIÓN DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO

La Comisión Académica del Programa de Doctorado en **Neurociencias** _____

en reunión celebrada el día ____ de _____ de 20____, ha acordado dar la conformidad a la presentación de la Tesis Doctoral titulada: **Adaptación de un sistema de propagación de priones *in vitro* para el cribado masivo de compuestos específicos frente a las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles humanas**

dirigida por el/la Dr/a. **Joaquín Castilla Castrillón y María V. Geijo Vázquez** _____

y presentada por Don/Dña. **Ezequiel González Miranda** _____

adscrito o adscrita al Departamento **Neurociencias** _____

En _____ a _____ de _____ de _____

EL/LA RESPONSABLE DEL PROGRAMA DE DOCTORADO

Fdo.: _____

AUTORIZACIÓN DEL DEPARTAMENTO

El Consejo del Departamento de **Neurociencias**

en reunión celebrada el día ___ de _____ de _____ ha acordado dar la conformidad a la admisión a trámite de presentación de la Tesis Doctoral titulada: **Adaptación de un sistema de propagación de priones *in vitro* para el cribado masivo de compuestos específicos contra las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles humanas**

dirigida por el/la Dr/a. **Joaquín Castilla Castrillón y María V. Geijo Vázquez**

y presentada por Don/ña. **Ezequiel González Miranda**

ante este Departamento.

En _____ a _____ de _____ de _____

VºBº DIRECTOR/A DEL DEPARTAMENTO

SECRETARIO/A DEL DEPARTAMENTO

Fdo.: _____

Fdo.: _____

ACTA DE GRADO DE DOCTOR O DOCTORA

ACTA DE DEFENSA DE TESIS DOCTORAL

DOCTORANDO/A DON/DÑA. Ezequiel González Miranda

TITULO DE LA TESIS: Adaptación de un sistema de propagación de priones *in vitro* para el cribado masivo de compuestos específicos frente a las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles humanas

El Tribunal designado por la Comisión de Postgrado de la UPV/EHU para calificar la Tesis Doctoral arriba indicada y reunido en el día de la fecha, una vez efectuada la defensa por el/la doctorando/a y contestadas las objeciones y/o sugerencias que se le han formulado, ha otorgado por _____ la calificación de:

unanimidad ó mayoría

--

SOBRESALIENTE / NOTABLE / APROBADO / NO APTO

Idioma/s de defensa (en caso de más de un idioma, especificar porcentaje defendido en cada idioma):

Castellano _____

Euskera _____

Otros Idiomas (especificar cuál/cuales y porcentaje) _____

En _____ a _____ de _____ de _____

EL/LA PRESIDENTE/A,

EL/LA SECRETARIO/A,

Fdo.: _____
Dr/a: _____

Fdo.: _____
Dr/a: _____

VOCAL 1º,

VOCAL 2º,

VOCAL 3º,

Fdo.: _____ Fdo.: _____ Fdo.: _____
Dr/a: _____ Dr/a: _____ Dr/a: _____

EL/LA DOCTORANDO/A,

Fdo.: _____

RESUMEN

El atípico agente causal de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EET) o enfermedades priónicas, un conjunto de desórdenes neurodegenerativos mortales que afectan a varios mamíferos incluidos los humanos, es una isoforma anormalmente plegada (PrP^{Sc}) de la proteína del prion celular (PrP^C) que adquiere propiedades neurotóxicas y la capacidad de inducir su conformación a otras proteínas del prion. A pesar de las numerosas estrategias terapéuticas desarrolladas durante las últimas décadas, alcanzando algunas de ellas la fase de ensayo clínico, ninguna ha sido efectiva frente a estas patologías en humanos. La escasez de modelos *in vitro* e *in vivo* adecuados para el estudio de las EET humanas junto con la falta de conocimientos sobre los mecanismos moleculares implicados en la patogenia de la enfermedad hacen que el cribado masivo de compuestos inhibidores de la propagación priónica en modelos de enfermedades priónicas animales sea una de las estrategias más exploradas en la actualidad. Así, la mayoría de las moléculas con potencial terapéutico estudiadas en modelos no específicos para las EET humanas, ha revelado un problema de especificidad de especie e incluso de cepa priónica que ha llevado al fracaso de las opciones terapéuticas cuando se han trasladado a humanos. Por ello, el desarrollo de un sistema *in vitro* de cribado masivo de compuestos con potencial anti-priónico específico para EET humanas podría ayudar a superar estas limitaciones que dificultan el desarrollo de una terapia, estableciéndose este como el objetivo principal de esta tesis doctoral.

Basándonos en la metodología de propagación priónica *in vitro* PMSA, y tras la modificación de los parámetros fundamentales, se han obtenido distintas isoformas de PrP recombinantes humanas malplegadas espontáneamente con características de priones *bona fide*. Estos han mostrado una alta resistencia a la digestión con proteasas, extraordinaria capacidad de auto-propagación a partir de cantidades ínfimas de semilla y potencial para causar una enfermedad priónica *in vivo*. La adaptación de estas PrP recombinantes humanas malplegadas a un sistema de cribado masivo basado en diluciones seriadas de la semilla priónica humana, ha permitido evaluar la capacidad de inhibir su propagación de un grupo de 18 compuestos tetrapirrólicos previamente detectados en un modelo de roedor. Esta prueba de concepto ha evidenciado que no todos los tetrapirroles testados presentan la misma capacidad anti-priónica frente a las semillas humanas, demostrando la validez de esta aproximación. A su vez, se ha explorado la capacidad de adsorción de las PrP recombinantes humanas malplegadas a la superficie de partículas de zirconio – sílice para implementar una metodología alternativa de propagación priónica *in vitro*. La exitosa utilización en PMSA de estas partículas con las proteínas malplegadas adsorbidas, ha permitido desarrollar una novedosa metodología de propagación sencilla, rápida, altamente reproducible y fácilmente adaptable para la búsqueda de

compuestos anti-priónicos en prácticamente cualquier laboratorio. De esta forma, los nuevos sistemas de cribado masivo de compuestos anti-priónicos han mostrado la capacidad para detectar potenciales inhibidores específicos de la propagación priónica humana, quedando validada esta nueva aproximación para la búsqueda de compuestos terapéuticos frente a estas devastadoras enfermedades neurodegenerativas.

SUMMARY

The atypical causal agent of Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSE) or prion diseases, a group of invariably fatal neurodegenerative disorders affecting several mammals including humans, is an abnormally folded isoform (PrP^{Sc}) of the cellular prion protein (PrP^C) that acquires neurotoxic properties and the capacity to induce its conformation to other cellular prion proteins. In spite of the numerous therapeutic strategies developed during the last decades, some of them reaching clinical trials, none has demonstrated efficacy in humans. The scarcity of adequate *in vitro* and *in vivo* models for studying human TSE together with the lack of knowledge on the molecular mechanisms underlying the pathological process makes the high throughput screening of prion propagation inhibitor molecules in models of animal prion disorders, one of the most explored strategies for treatment development nowadays. Thus, some of the molecules detected in these model systems, non-specific for human prion diseases, have shown species or even prion strain specificity issues, leading to failure when assayed in humans. In the light of such problems, the development of a high throughput screening system specific for the detection of compounds effective against human prions, the main purpose of this thesis, could help to overcome this limitation hindering the discovery of a therapy.

Based on the *in vitro* prion propagation methodology PMSA and after the modification of fundamental parameters, we were able to obtain different isoforms of spontaneously misfolded recombinant human PrP with several characteristics expected for *bona fide* prions. They are highly resistant to protease digestion, show an extraordinary capacity of self-propagation from insignificant amounts of seed and the potential to induce a prion disease *in vivo*. The adaptation of these misfolded recombinant human proteins to be used in a high throughput screening system based on serial dilutions, allowed us to evaluate the capacity of 18 tetrapyrrolic compounds previously detected in a rodent prion-based assay, to inhibit the propagation of the human seeds. These proof of concept revealed that not all the tetrapyrrolics tested present the same anti-prion capacity against the human seeds, in contrast to the findings in the rodent based system, demonstrating the utility of this approach. Moreover, the capacity of the misfolded recombinant human PrP seeds to be adsorbed in the surface of glass beads was explored in order to implement an alternative methodology for *in vitro* prion propagation. The success on using the human seed-containing glass beads in PMSA permitted

the development of a novel propagation method which is fast, simple, highly reproducible and easily adaptable to the search of anti-prion molecules in any laboratory. Thus, two novel high throughput screening methods have been developed that have demonstrated the ability to detect potential prion propagation inhibitors specific for human seeds, validating this approach for the search of therapeutic compounds against the devastating human prion disorders.

ABREVIATURAS/GLOSARIO

- μg : microgramo
- μl : microlitro
- μm : micrómetro
- nm: nanómetro
- ° C: grado centígrado
- 3F4: anticuerpo monoclonal anti-PrP denominado 3F4
- 4R β S: modelo de hoja- β en solenoide de cuatro pisos

A

- AFM: microscopía electrónica de fuerza atómica, del inglés, *atomic force microscopy*
- ASO: oligonucleótido antisentido, del inglés, *Antisense Oligonucleotide*

B

- BSE: del inglés, *Bovine Spongiform Encephalopathy*

C

- CC: del inglés, *charged cluster*
- CD: del inglés, *Circular Dichroism*
- CJD: del inglés, *Creutzfeldt-Jakob Disease*
- CPEB: del inglés, *cytoplasmic polyadenylation element binding protein*
- CMV: citomegalovirus
- C-terminal: extremo carboxilo terminal
- CWD: del inglés, *Chronic Wasting Disease*
- cryoEM: criomicroscopía electrónica

D

- Da: dalton
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- DNAsa: deoxirribonucleasa
- dNTP: del inglés, *deoxynucleotide triphosphates*
- DO₆₀₀: densidad óptica a 600nm
- dpi: días post-inoculación
- DY: *Drowsy*, cepa de prion de hamster
- D18: anticuerpo monoclonal anti-PrP denominado D18

E

-
- EA: enfermedad de Alzheimer
- *E. coli*: *Escherichia coli*, bacteria gramnegativa de la familia de las enterobacterias utilizada extensivamente en la producción de proteínas recombinantes
- EDTA: etilendiaminotetraacético
- EET: encefalopatía espongiforme transmisible

- EP: enfermedad de Parkinson
- EUE: del inglés, *Exotic Ungulate Encephalopathy*

F

- F: del inglés, *forward*
- FFI: del inglés, *Fatal Familial Insomnia*
- FSE: del inglés, *Feline Spongiform Encephalopathy*
- FTIR: del inglés, *fourier transform infrared spectroscopy*

G

- *g*: fuerza centrífuga relativa
- gCJD: del inglés, *genetic Creutzfeldt-Jakob Disease*
- GPI: del inglés, *glycosylphosphatidylinositol*
- GSS: Gerstmann-Sträussler-Scheinker
- GFAP: del inglés, *Glial Fibrillary Acidic Protein*
- Gdn-HCl: hidrocloreuro de guanidinio

H

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

I

- iCJD: del inglés, *iatrogenic Creutzfeldt-Jakob Disease*
- IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiraósido

K

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

L

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

M

- M: molar
- MD: del inglés, *Molecular Dynamics*
- mg: miligramo
- min: minuto
- ml: mililitro
- mm: milímetro
- mM: milimolar
- MAVS: del inglés, *Mitochondrial Antiviral Signaling*

N

- ng: nanogramo
- nm: nanómetro
- N-terminal: extremo amino terminal
- Nor98: cepa de prion ovino atípica
- N2a: línea celular de neuroblastoma de ratón

O

- OPRI: del inglés, *Octapeptide Repeat Insertions*
- OPRD: del inglés, *Octapeptide Repeat Deletions*
- 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*
- PIRIBS: modelo de hoja- β paralela en registro
- PK: proteinasa K
- PM: marcador de peso molecular
- PMCA: del inglés, *Protein Misfolding Cyclic Amplification*
- PMSA: del inglés, *Protein Misfolding Shaking Amplification*
- PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- *PRNP*: gen que codifica la proteína PrP
- *PRNP^{-/-}*: animal transgénico KO para el gen que codifica la proteína PrP
- *PRNP^{+/-}*: animal transgénico hemicigoto para el gen que codifica la proteína PrP
- *PRNP^{+/+}*: animal transgénico homocigoto para el gen que codifica la proteína PrP
- PrP: proteína del prion, del inglés, *Prion protein*
- PrP*: PrP en un estado conformacional transitorio, intermedio entre PrP^C y PrP^{Sc}
- PrP²⁷⁻³⁰: PrP resistente a PK de 27-30 kDa
- PrP^C: isoforma celular de PrP, del inglés, *cellular prion protein*
- PrP^{res}: PrP resistente a la digestión con PK
- PrP^{Sc}: isoforma patógena de PrP, del inglés, *Scrapie associated Prion Protein*
- PVDF: polifluoruro de vinilideno

Q

- QUIC: del inglés, *quaking induced conversion*

R

- R: del inglés, *reverse*
- rec-PrP: PrP recombinante
- rec-PrP^{res}: PrP recombinante malplegada resistente a PK
- RL: del inglés, *Rigid Loop*
- RML: cepa de prion ovino adaptado a ratón en el *Rocky Mountain Laboratory*
- RNA: ácido ribonucleico

- RNAi: ácido ribonucleico de interferencia
- RNAm: ácido ribonucleico mensajero
- rpm: revoluciones por minuto
- RER: retículo endoplasmático rugoso
- RMN: resonancia magnética nuclear
- RT-QuIC: del inglés, *Real Time - Quaking Induced Conversion*

S

- s: segundo
- SAF83: anticuerpo monoclonal denominado SAF83
- SAXS: dispersión de rayos X de ángulo pequeño
- sCJD: del inglés, *sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease*
- sFI: del inglés, *sporadic Fatal Insomnia*
- Sinc: gen *Sinc*, del inglés, *Scrapie Incubation*
- SIP: gen *SIP*, del inglés, *Shorter Incubation Period*
- SNC: sistema nervioso central
- Sup35: gen de levadura que codifica un factor terminador de transcripción
- SDS-PAGE: del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

T

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

U

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

V

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

W

- WT: del inglés, *Wild-Type*

Y

- Y145Stop: mutación asociada al GSS

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

<u>RESUMEN</u>	8
<u>SUMMARY</u>	9
<u>ABREVIATURAS/GLOSARIO</u>	11
<u>ÍNDICE</u>	16
<u>INTRODUCCIÓN</u>	19
1. Definición de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles y búsqueda del agente causal	19
1.1. Descubrimiento de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles y primeros avances hacia la determinación del agente causal	21
1.2. Las evidencias conducen hacia la hipótesis de “solo proteína”	25
1.3. Hipótesis de “solo proteína”	26
1.4. Confirmación de la hipótesis de “solo proteína”	30
1.4.1. Los estudios con modelos animales apoyan la hipótesis de “solo proteína”	30
1.4.2. Los modelos <i>in vitro</i> generados respaldan la hipótesis de “solo proteína”	32
2. Biología de los priones	35
2.1. El gen <i>PRNP</i>	35
2.2. PrP ^C	36
2.3. Mecanismos de conversión.....	42
2.4. PrP ^{Sc}	46
2.4.1. Heterogeneidad de los agregados de PrP recombinantes obtenidos <i>in vitro</i>	47
2.4.2. Modelos estructurales de las fibras de PrP ^{Sc}	48
2.4.3. Mecanismos de neurotoxicidad	53
2.4.4. Rutas de entrada y diseminación por el organismo	55
3. Fenómenos de cepas y barrera de transmisión	58
3.1. Fenómeno de cepa.....	58
3.2. Barrera de transmisión	61
4. Encefalopatías Espongiformes Transmisibles humanas	63
5. Sistemas de propagación <i>in vitro</i> de priones	66
5.1. Sistemas de propagación <i>in vitro</i>	68
5.1.1. Ensayo de conversión libre de células	68
5.1.2. Amplificación cíclica de proteínas malplegadas: PMCA	68
5.1.3. Conversión inducida por agitación en tiempo real: RT-QuIC.....	70
5.1.4. Amplificación de proteínas malplegadas por agitación: PMSA	72
6. Estrategias terapéuticas contra las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles humanas.....	73
6.1. Estrategias basadas en el sistema inmunitario	74
6.2. Estrategias basadas en la reducción de la cantidad de PrP ^C	75
6.3. Estrategias basadas en la degradación de PrP ^{Sc}	76
6.4. Estrategias basadas en compuestos químicos con actividad anti-priónica	77

OBJETIVOS	80
MATERIALES Y MÉTODOS	81
1. Construcción de los plásmidos de expresión de las PrP de humano M129 y V129, humano M109I M129 y M109I V129, de topillo rojo y de oveja ARQ	81
1.1. Generación de plásmidos con PrP humana M129 y V129, topillo rojo I109 y oveja ARQ mediante recombinación homóloga	81
1.2. Generación de plásmidos con PrP humana M109I V129 y M109I M129 mediante mutagénesis dirigida secuencial en dos pasos	84
2. Obtención de proteínas recombinantes	87
2.1. Transformación en bacterias <i>E. coli Rossetta (DE3)TM</i>	87
2.2. Expresión y purificación de las PrP recombinantes para su uso en los sistemas de propagación <i>in vitro</i>	87
3. PMSA como método de generación y propagación de proteínas malplegadas <i>in vitro</i>	89
3.1. Preparación de sustratos para PMSA	89
3.2. Ensayo para determinar la adsorción de las PrP recombinantes a superficies de vidrio	91
3.3. PMSA para propagación de PrP malplegada <i>in vitro</i>	91
3.4. PMSA para la generación de PrP malplegada <i>in vitro</i> de forma espontánea	92
4. Generación espontánea de fibras amiloides en presencia de hidrocloreuro de guanidinio	93
5. Generación espontánea de agregados amorfos de PrP mediante agitación	94
6. Propagación de PrP malplegada mediante PMCA	94
6.1. Preparación de sustratos para PMCA basada en PrP recombinante complementada con encéfalos de ratón KO-PrP	94
6.2. Preparación de sustratos para PMCA basada en homogeneizados de encéfalos de ratón	95
6.3. Propagación de priones recombinantes y procedentes de encéfalo mediante PMCA en presencia de compuestos inhibidores	96
6.4. Propagación de PrP malplegadas obtenidas por PMSA en PMCA basadas en homogeneizados de encéfalos para la determinación de la infectividad <i>in vivo</i> potencial	97
7. Detección de PrP malplegada	98
7.1. Digestión de PrP malplegada con proteinasa K	98
7.2. Detección de proteínas mediante electroforesis y tinción de proteína total con <i>BlueSafe</i>	99
7.3. Detección de proteínas mediante electroforesis y <i>Western Blot</i>	100
7.4. Detección de fibras amiloides mediante Tioflavina T	101
8. PMSA adaptada al cribado masivo de compuestos con potencial actividad anti-priónica específicos para PrP malplegada humana	102
9. Adsorción de PrP recombinante malplegada a partículas esféricas y propagación por PMSA	103
10. PMSA basada en partículas esféricas adsorbidas adaptada al cribado masivo de compuestos con potencial actividad anti-priónica	104
RESULTADOS	106
1. Especificidad de especie y cepa de los compuestos inhibidores detectados mediante un sistema de cribado masivo desarrollado con PrP de topillo rojo	106
2. Generación de PrP recombinantes humanas malplegadas mediante PMSA	107

2.1. Generación de PrP recombinantes humanas malplegadas mediante el uso de cepas priónicas humanas de origen encefálico	108
2.2. Generación espontánea de PrP recombinantes humanas malplegadas mediante PMSA.....	111
3. Adaptación de los parámetros del sistema de PMSA para la generación espontánea de PrP recombinantes humanas malplegadas	114
3.1. Mejoras en el sustrato	114
3.2. Optimización de las partículas esféricas y la velocidad de agitación	119
4. Aplicación del sistema de PMSA adaptado para la obtención de cepas recombinantes humanas espontáneas.....	123
5. Caracterización de las rec-PrP^{res} recombinantes humanas generadas	126
5.1. Ensayo de resistencia a PK	126
5.2. Capacidad de propagación mediante diluciones seriadas por PMSA	126
5.3. Comparativa entre las proteínas malplegadas producidas por PMSA y otros agregados de rec-PrP... ..	129
5.4. Determinación de la infectividad potencial por PMCA.....	136
6. Adaptación de las rec-PrP^{res} recombinantes humanas a un sistema de cribado masivo basado en diluciones y prueba de concepto	140
6.1. Adaptación de las PrP recombinantes humanas malplegadas al sistema de PMSA para el cribado de compuestos anti-priónicos.....	141
6.2. Prueba de concepto del sistema de cribado utilizando un panel de compuestos tetrapirrólicos ..	146
7. Adsorción de las PrP recombinantes humanas malplegadas a partículas esféricas y desarrollo de un ensayo de cribado alternativo	149
7.1. Adsorción de las rec-PrP ^{res} humanas a partículas esféricas de zirconio-sílice	149
7.2. Propagación mediante PMSA utilizando partículas esféricas adsorbidas como semillas a diferentes velocidades de agitación	152
7.3. Propagación en rondas de PMSA de distinta duración utilizando partículas esféricas adsorbidas como semilla	153
7.4. Prueba de concepto del sistema alternativo de cribado de compuestos anti-priónicos basado en p partículas esféricas adsorbidas	155
<u>DISCUSIÓN</u>	159
<u>CONCLUSIONES</u>	181
<u>REFERENCIAS</u>.....	182

INTRODUCCIÓN

1. Definición de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles y búsqueda del agente causal

Las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EET), también conocidas como enfermedades priónicas, son un conjunto de enfermedades neurodegenerativas raras, mortales y transmisibles que afectan a una gran variedad de mamíferos, incluidos los seres humanos. Entre las que afectan a los seres humanos encontramos la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD, del inglés, *Creutzfeldt-Jakob Disease*), el Insomnio Familiar Letal (FFI, del inglés, *Fatal Familial Insomnia*), la enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), el kuru y la Prionopatía con Sensibilidad Variable a Proteasas (VPSPr, del inglés, *Variable Proteases-Sensitive Prionopathy*), la cual ha sido descrita recientemente [1, 2]. Además, otras EET han sido descritas en diferentes especies de mamíferos, entre las cuales destacan varias debido a su impacto tanto económico como a nivel de salud pública. Estas son el scrapie o tembladera que afecta a ovejas, cabras y muflones; la Encefalopatía Espongiforme Bovina (BSE, del inglés, *Bovine Spongiform Encephalopathy*) que afecta a bóvidos y que fue la causante de la epidemia de las “vacas locas” en el Reino Unido y otros países a principios de la década de los 90, y la Enfermedad Debilitante Crónica (CWD, del inglés, *Chronic Wasting Disease*) que se presenta en los cérvidos, la cual constituye la primera EET que se ha detectado en animales salvajes, aunque también afecta a cérvidos en cautiverio [3]. Además, se han descrito otras EET, como la Encefalopatía Espongiforme Felina (FSE, del inglés, *Feline Spongiform Encephalopathy*) en gatos domésticos, la Encefalopatía de Ungulados Exóticos (EUE, del inglés, *Exotic Ungulate Encephalopathy*) en rumiantes exóticos de zoológicos y la Encefalopatía Transmisible del Visón (TME, del inglés, *Transmissible Mink Encephalopathy*), en visones en cautividad [4, 5].

Este conjunto de enfermedades se caracteriza por largos periodos de incubación hasta la aparición de los primeros signos clínicos y un corto periodo de tiempo entre el debut de la enfermedad y el fallecimiento del paciente (típicamente entre 6 meses y dos años, aunque puede durar hasta más de una década en algunas de sus variantes) [3, 4]. Las enfermedades priónicas, aunque constituyen un grupo de enfermedades heterogéneo desde el punto de vista clínico y epidemiológico, presentan una serie de características clínicas comunes, destacando principalmente una disfunción motora y cognitiva progresiva, así como una importante ataxia cerebelar. Desde el punto de vista neuropatológico todas ellas comparten rasgos característicos como: 1) una severa espongiosis de la sustancia gris asociada con la muerte neuronal, lo que le confiere el aspecto microscópico de esponja característico al encéfalo de los pacientes; 2) una marcada gliosis reactiva, tanto de astrocitos como microglía, y 3) la acumulación y depósito en el tejido cerebral de agregados proteicos como

consecuencia del malplegamiento de una proteína (Figura 1). Cabe destacar que todas estas características, aun siendo comunes para diferentes enfermedades priónicas, son muy variables en su naturaleza, distribución y gravedad entre las diferentes entidades nosológicas [3, 6]. Todo esto, junto con la gran similitud de las EET con otros desórdenes neurológicos, hace que para el diagnóstico preciso y definitivo de una EET sea necesario el estudio *post mortem* del encéfalo, donde se observarán microscópicamente todos o la gran mayoría de estos rasgos neuropatológicos.



Figura 1. Anomalías histopatológicas observables en los encéfalos de individuos afectados por una enfermedad priónica. a) Imagen del córtex frontal de un paciente de CJD donde se aprecia el daño espongiiforme. Tinción con hematoxilina & eosina. 20x b) Deposición de PrP en el córtex frontal de paciente de CJD. Tinción con anticuerpo anti-PrP 12F10. 20x c) Aumento de gliosis reactiva en el tálamo de paciente de FFI. Tinción con anticuerpo anti-Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP, del inglés, *Glial Fibrillary Acidic Protein*). 40x. (Modificado de [1]).

Por otro lado, las enfermedades priónicas presentan una importante característica que se considera única para este grupo de patologías. Esta característica única es su transmisibilidad entre individuos dentro de la misma o diferentes especies, convirtiéndola en una entidad infecciosa debido a la capacidad autopropagativa del agente causal responsable de la misma [7]. No obstante, la similitud con otras patologías está siendo el foco de una profunda discusión dentro del campo, ya que diversos investigadores defienden que los mecanismos que gobiernan otras enfermedades, tanto neurodegenerativas como sistémicas, son similares a los mecanismos de propagación e infección de las EET [8]. Así, existen estudios que indican que la administración exógena de agregados del péptido β -amiloide (péptido A β) o de α -sinucleína (α -syn), relacionados con la enfermedad de Alzheimer (EA) y la enfermedad de Parkinson (EP) respectivamente, provocan la aparición de signos clínicos y marcadores relacionados con la enfermedad en modelos animales murinos, apoyando la diseminación tipo priónica de estos agentes [9-11].

La capacidad autopropagativa del agente causal y la transmisibilidad de la enfermedad entre individuos incluso de diferentes especies llevó a las primeras teorías sólidas acerca de que las enfermedades priónicas podrían estar causadas por un virus [12]. La existencia de un agente vírico responsable de estas patologías estaba en consonancia con la variabilidad clínica y neuropatológica descritas, ya que sugerían la existencia de diferentes cepas del virus. Además, todo esto unido a los

largos periodos de incubación característicos de las enfermedades priónicas hizo que se considerasen causadas por un “virus lento”. Sin embargo, la incapacidad de aislar el agente vírico y la falta de evidencia científica durante el transcurso de los años empezó a decantar la balanza hacia una de las propuestas más controvertidas en la historia de la ciencia, la cual cuestionaba el dogma central de la biología: la posible existencia de un agente de naturaleza proteica como responsable de las enfermedades priónicas [13]. Esta propuesta, ampliamente aceptada y finalmente demostrada, llevó a Stanley S. Prusiner a ser laureado en 1997 con el premio Nobel de Medicina.

1.1. Descubrimiento de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles y primeros avances hacia la determinación del agente causal

Las inusuales características del agente causal respecto a otros patógenos conocidos y la gran heterogeneidad dentro de las EET hacen que este grupo de enfermedades haya sido objeto de profundas discusiones científicas y de grandes controversias desde el inicio de su estudio hasta prácticamente la actualidad. La primera referencia documentada sobre una enfermedad priónica es de 1732, donde se informó de la existencia de scrapie o “tembladera” en ovejas merinas de raza española importadas a Reino Unido [12]. Tras este brote de scrapie en la región de Lincolnshire, ganaderos de la misma región trasladaron al parlamento británico una petición para que se adoptara una mayor regulación en la importación de ovejas merinas españolas debido a dicho brote. Durante los años venideros se fueron sucediendo diferentes comunicaciones escritas en medios de carácter científico, como el breve párrafo elaborado por Thomas Davies en 1811 y publicado en la revista *General View of Agriculture of Wiltshire*, donde describían de forma somera los signos que presentan las ovejas con scrapie y lo relacionaba con el brote acaecido 80 años antes en Lincolnshire. Décadas más tarde empezaron a aparecer las primeras teorías acerca de la causa de esta enfermedad. En 1848 Roche-Lubin postuló que se debía a la sobreactividad sexual de las ovejas de estos rebaños o a tormentas eléctricas. Besnoit en 1899 propuso que se debía a un “agente filtrable” de naturaleza vírica. Otra de las teorías fue propuesta por M’Gowan a principios del siglo XX, donde afirmaba que la enfermedad estaba asociada al parásito protozoo *Sarcosporidium* [12]. Sin embargo, no fue hasta 1936 cuando se demostró la naturaleza transmisible del scrapie por parte de Cuille y Chelle. Los estudios realizados por ambos investigadores demostraron la transmisibilidad de la enfermedad mediante la inyección intraocular en ovejas sanas de medula espinal procedente de ovejas afectadas por scrapie [14]. Este estudio reavivó el interés por la tembladera dentro de la comunidad científica y además permitió constatar los largos periodos de incubación necesarios para la manifestación de la enfermedad. Varios años más tarde, William Gordon, del instituto Moredun en Escocia, repitió los experimentos de Cuille y Chelle con 697 animales, demostrando de nuevo la transmisión de la

enfermedad. Además, de su estudio también se concluye que la formalina, compuesto altamente eficaz contra los virus, no provoca la inactivación del patógeno [15]. La II Guerra Mundial frenó los estudios de la “tembladera” con la notable excepción de los llevados a cabo por D.R. Wilson, aunque gran parte de sus avances permanecieron sin publicar, ya que se mostró reacio a presentar datos sobre un patógeno tan poco ortodoxo. Todos estos avances en su conjunto llevaron a establecer la idea en la comunidad científica de que se enfrentaban a un agente causal con propiedades muy peculiares, destacando su resistencia a la formalina [12].

En paralelo y sin ninguna relación con los estudios del scrapie en ovejas, en la década de los años 20 dos neurólogos alemanes, Hans Gerhard Creutzfeldt y Alfons Maria Jakob, describieron de forma independiente un nuevo desorden neurológico de etiología desconocida y de evolución rápida, sentando las bases de lo que se conoce hoy en día como Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD, del inglés, *Creutzfeldt-Jakob Disease*) [16, 17], término usado por primera vez para referirse a esta nueva enfermedad por Walther Spielmeyer en 1922 [18]. Paradójicamente, posteriores análisis patológicos del caso descrito por Creutzfeldt en 1920 determinaron que no se trataba de una EET, según la definición actual. Sin embargo, al menos dos de los cinco casos descritos por Jakob coinciden con los criterios actuales para definirlos como enfermedad priónica. Cabe destacar que fue Jakob quien en una publicación en 1923 afirmó que el caso descrito por Creutzfeldt era el mismo desorden neurológico que el que él había descrito unos años más tarde o que al menos estaban nosológicamente muy relacionados. Aun con todo esto, esta nueva patología recibió y conserva hoy en día el nombre de Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob [19]. Con el paso de los años se describió un gran número de enfermedades neurológicas que se englobaron de forma errónea dentro del grupo de CJD o, por el contrario, se designaron como patologías nuevas y diferentes; todo ello fomentado por el gran desconocimiento, controversia y dificultades para un diagnóstico preciso y fiable.

Es en la década de los 50 cuando se produce uno de los descubrimientos y avances más relevantes en el estudio de las enfermedades priónicas, acercando considerablemente a la comunidad científica a una descripción más realista del agente causal. Este hito fue el descubrimiento y descripción del kuru, un desorden neurológico que afectaba de forma endémica a los fore, un grupo étnico de Papúa-Nueva Guinea, y que presentaba grandes similitudes con la CJD [20]. Fue Vincent Zigas, el oficial médico de la región, quien en 1955 se percató de que un tipo de encefalitis desconocida hasta la fecha afectaba a dicha población. “kuru” en el idioma de los fore significa “temblar de fiebre o de frío”, ya que los individuos afectados presentaban temblores y graves problemas motores, perdían totalmente la capacidad de caminar o mantenerse erguidos y en última instancia la totalidad de los enfermos fallecían [21]. Los hallazgos de Vincent Zigas sobre esta nueva encefalitis atrajeron al médico estadounidense de origen húngaro Carleton Gajdusek a la isla, con el objetivo de estudiarla más en

detalle. Las observaciones y estudios de Gajdusek resultarían fundamentales en la descripción y definición del kuru y recibió por ello el Premio Nobel de Medicina en 1976. Sus primeros trabajos en Papúa-Nueva Guinea le llevaron a formular la hipótesis de que la enfermedad era causada por un “virus lento”, descartando un origen genético de la enfermedad. Gajdusek se percató de que la enfermedad afectaba principalmente a niños y mujeres y esto le llevó a conjeturar que las prácticas endocanibalísticas de los fore eran la causa más probable de esta enfermedad. En estos rituales era común que el encéfalo y médula espinal del familiar fallecido fuese consumido por su mujer e hijos. Por lo tanto, cuando una persona fallecida por esta enfermedad moría, el agente infeccioso ya se encontraba en su sistema nervioso y su ingesta provocaba la transmisión de la enfermedad entre las personas que los consumían. Así, Gajdusek teorizó que un “virus lento” afectaba al sistema nervioso de fallecidos y su ingesta era la causa de la enfermedad y de su transmisión dentro de la comunidad. Además, describió el cuadro clínico de la enfermedad, destacando que los enfermos presentaban un desorden único hasta la fecha, con una sintomatología cerebelar de ataxia, pérdida del equilibrio, dificultades en la marcha y temblores, lo cual progresaba hasta llevar a la muerte del individuo, que en la mayoría de los casos tardaba menos de un año [21].

En 1957 fue Igor Klatzo, un neurólogo de origen polaco, quien observó a partir de las muestras de Gajdusek que el kuru era la enfermedad más parecida hasta la fecha a la CJD. Los estudios publicados por Klatzo y Gajdusek mostraron que los enfermos de kuru presentan placas amiloides en sus encéfalos, haciendo la primera referencia a “placas de kuru” [22]. A pesar de todos estos avances en el conocimiento de la enfermedad, los intentos por aislar al agente causal y los intentos de transmitir la enfermedad a modelos animales fueron infructuosos [21].

William Hadlow, un patólogo veterinario experto en el estudio del scrapie fue quien en 1959 realizó una observación que supuso un giro drástico en los avances realizados hasta la fecha. Durante su visita al Wellcome Medical Museum de Londres tuvo la oportunidad de observar las fotografías de las lesiones espongiiformes que el kuru provocaba. Gracias a su conocimiento en este tipo de lesiones en el scrapie, rápidamente reparó en el parecido de las lesiones histopatológicas de ambas enfermedades. Esto le llevó en julio de 1959 a escribir una misiva a Gajdusek donde le advertía de la gran similitud entre ambas enfermedades [23, 24]. Estas observaciones animaron a Gajdusek, Alpers y Gibbs a demostrar la transmisión experimental del kuru a chimpancés, usando material procedente de encéfalos de personas fallecidas por dicha enfermedad [25, 26]. Se trataba de la primera relación establecida entre las EET descritas en humanos y en animales. Tras la publicación de este trabajo y gracias a las primeras observaciones realizadas por Klatzo, se empezaron a relacionar estas enfermedades con la CJD. En 1968, Gajdusek, Gibbs y Alpers consiguieron transmitir la CJD a chimpancés [27], demostrando definitivamente que ambas enfermedades son transmisibles tras su

inoculación intracerebral y concluyendo, sin lugar a dudas, que esta también era una EET estrechamente relacionada con el kuru y el scrapie.

Además de la descripción del kuru y la CJD durante las primeras décadas del siglo XX, en 1936 Josef Gerstmann, Ernst Strüssler y Ilya Mark Scheinker describieron una familia con varios miembros fallecidos debido a una demencia progresiva y caracterizada por ataxia cerebelosa, conocido hoy en día como Síndrome de Gerstmann-Strüssler-Scheinker (GSS) [28, 29]. Se trata de un síndrome familiar con una herencia autosómica dominante. La primera mutación patogénica asociada con el GSS fue descrita en 1989, momento a partir del cual se incluyó dentro del grupo de enfermedades priónicas humanas como un síndrome diferenciado de la CJD [30].

Durante la segunda mitad del siglo XX fueron descritas nuevas EET humanas, así como otras EET en diferentes animales. En 1986, Lugaresi y colaboradores publicaron un artículo científico describiendo lo que ellos denominaron Insomnio Familiar Letal (FFI, del inglés, *Fatal Familial Insomnia*). Se trata un desorden hereditario que se caracteriza por graves alteraciones del sueño, disautonomía y déficits motores asociados a una severa atrofia [31]. Los estudios de Lugaresi y colaboradores condujeron en 1992 a la identificación de la mutación causante de esta enfermedad, considerada como una nueva entidad nosológica dentro de las enfermedades priónicas humanas [32]. Dentro del grupo de las prionopatías que afectan a humanos la última en describirse ha sido la Prionopatía con Sensibilidad Variable a Proteasas (VPSPr, del inglés, *Variable Proteases-Sensitive Prionopathy*). Esta rara enfermedad priónica fue descrita en 2008 por Gambetti y colaboradores y se caracteriza por rasgos histopatológicos distintos a los descritos hasta ahora para las enfermedades priónicas. La VPSPr está asociada a una isoforma de la proteína priónica que es sensible a la digestión por proteasas, al contrario de todas las descritas hasta la fecha para las demás EET humanas [33]. Además, también han sido descritas otras EET en diferentes mamíferos: la Enfermedad Crónica Debilitante de Cérvidos [34], la Encefalopatía Transmisible del Visón [35], la Encefalopatía Espongiforme Felina [36], la Encefalopatía de Ungulados Exóticos [37, 38] y la Encefalopatía Espongiforme Bovina [39], causante de la epidemia de las “vacas locas” durante la década de los 90 y cuya transmisión a humanos provocó lo que se conoce como la variante o nueva variante de la CJD (vCJD, del inglés, *variant CJD*) [40].

Por último y no de menos importancia fue el descubrimiento accidental de la transmisión iatrogénica de la CJD a humanos, causando lo que se conoce hoy en día como CJD iatrogénica (iCJD, del inglés, *iatrogenic CJD*). En una publicación de 1974 se describía el caso de una mujer que había fallecido debido a un trasplante de córnea de un donante que, como se confirmaría *a posteriori*, falleció debido a la CJD [41].

1.2. Las evidencias conducen hacia la hipótesis de “solo proteína”

Tras todo el conocimiento generado acerca de las enfermedades priónicas durante la primera mitad del siglo XX, los esfuerzos se centraron en identificar la naturaleza del agente causal. A pesar del intento fallido de Gordon de inactivar el agente del scrapie con formalina, los experimentos llevados a cabo hasta la fecha apoyaban la hipótesis, formulada por primera vez por Sigurdsson en 1954, de que la enfermedad estaba causada por un “virus lento”. Todos los experimentos llevados a cabo para esclarecer la identidad del patógeno cumplían los postulados de Koch, formulados por Robert Koch a finales del siglo XIX, y los cuales establecían la base para determinar el origen infeccioso de una enfermedad [42]. Así, la enfermedad pudo ser transmitida a primates y estos desarrollaron los signos clínicos característicos de la enfermedad en humanos. Se confirmó además la transmisión entre primates mediante un segundo pase y mediante diluciones seriadas del material infeccioso filtrado, lo que implicaba que el agente causal se podía aislar de nuevo del animal infectado y que este se propagaba en el nuevo hospedador. Finalmente, los experimentos de transmisión a primates de otras enfermedades no relacionadas confirmaron que el agente causal es único para las enfermedades priónicas. Todas estas evidencias, a pesar de la imposibilidad de aislar el agente patógeno del encéfalo de personas afectadas o de cultivos celulares, condujeron a aceptar la hipótesis del “virus lento” como válida durante algunos años. Gibbs y Gajdusek propusieron el término de Encefalopatía Viral Espongiforme Subaguda no solo para la CJD sino también para otras enfermedades priónicas humanas, como el kuru, y para el scrapie y la Encefalopatía transmisible del Visón (TME) [43, 44]. Unido a la demostración de que el agente causal confinado fundamentalmente en el SNC era transmisible, filtrable y autoreplicativo, y daba lugar a una enfermedad con tiempos de incubación largos e inevitablemente mortal, Pattison y colaboradores en 1961 llevaron a cabo otros experimentos cruciales para apoyar la hipótesis del “virus lento” [45]. Además de demostrar la extraordinaria resistencia del scrapie a formalina, lo que dejaba patente una vez más la naturaleza atípica de este patógeno [46], los experimentos de inoculación llevados a cabo por estos investigadores demostraron que el scrapie podía ser transmitido a cabras y a distintas razas de ovejas con distintos grados de susceptibilidad. Fue la primera vez que se estableció el concepto de barrera de transmisión. Además, describieron por primera vez la existencia de diferentes cepas de priones, conocidas como “scratchy” y “drowsy”, dado que las cabras infectadas con el mismo aislado de scrapie presentaban diferencias en los tiempos de incubación, signos clínicos y perfil de lesiones en el SNC [47]. La existencia de diferentes cepas de priones se interpretó como un apoyo a la teoría del “virus lento”, dado que las diferentes manifestaciones de la enfermedad se podían atribuir a cambios en el material genético del virus.

Otro de los grandes avances fue la transmisión de aislados de scrapie de cabras [48, 49] y ovejas [50] a ratones de genotipo silvestre (WT, del inglés, *wild-type*). Esto permitió demostrar por un lado que la transmisión entre especies taxonómicamente más alejadas era posible y, por otro lado, permitió llevar a cabo experimentos de laboratorio a gran escala ya que dio lugar a los primeros modelos de laboratorio, más manejables que los pequeños rumiantes u otros modelos naturales de enfermedad. Todos estos descubrimientos y avances llevaron a la aparición de todo tipo de teorías para establecer el origen del escurridizo patógeno: viroides, membranas con capacidad autoreplicativa o elementos de tipo retrovirus son solo algunas de ellas [12]. Sin embargo, debido a la imposibilidad de aislar al agente causal y de la ausencia de respuesta inmunitaria del huésped, ninguna de estas teorías pudo ser demostrada. Esto no frenó el avance en el campo de las EET y gracias al uso del ratón como modelo experimental se volvieron a dar importantes pasos hacia el descubrimiento del agente causal. Así pues, los adeptos de la hipótesis del “virus lento” fueron disminuyendo a medida que las pruebas en contra de esta teoría eran más numerosas. Los experimentos llevados a cabo por Tikvah Alper y colaboradores resultaron claves para descartar el posible origen vírico. En estos experimentos demostraron que el agente causal del scrapie era resistente a la radiación ultravioleta (UV) y a nucleasas en concentraciones muy superiores a las comúnmente utilizadas para inactivar cualquier ácido nucleico [51, 52]. Además, también estimaron que el tamaño del agente causal del scrapie era demasiado pequeño para tratarse de una partícula vírica o cualquier otro microorganismo conocido, estableciendo su peso molecular en menos de 2×10^5 Da [53]. Los resultados mostrados por Alper sugerían la existencia de un patógeno capaz de multiplicarse en el nuevo huésped sin necesidad de estar asociado a ningún ácido nucleico. Esto fue rechazado en la época por gran parte de la comunidad científica, ya que contradecía el dogma central de la biología. No obstante, las investigaciones sobre la naturaleza del agente causal llevadas a cabo por Alper permitieron a John S. Griffith, un químico y biofísico británico, ser el primero en proponer una teoría que se sustentaba en la posible existencia de una estructura proteica como agente causal de las EET. Griffith describió las posibles formas que el potencial agente proteico podría tener para multiplicarse y, todo ello, en el contexto de la biología molecular de la época [13]. Se trataba por tanto de la hipótesis más cercana a la hipótesis de “solo proteína”, ampliamente aceptada hoy en día.

1.3. Hipótesis de “solo proteína”

Durante las siguientes décadas, fueron muchos los investigadores que siguieron los pasos iniciados por Griffith, lo que llevó a un aumento de las evidencias a favor de la naturaleza proteica del agente infeccioso. Fue Stanley Prusiner quien en la década de los 80 realizó los experimentos cruciales para la determinación de la naturaleza del agente causal, por lo que recibió el Premio Nobel de Medicina en

1997. Prusiner sometió tejidos de animales infectados con scrapie a métodos de inactivación de proteínas, como el fenol, el hidrocloreuro de guanidinio, la urea y detergentes y observó que la infectividad de las muestras desaparecía [54]. Estos experimentos, junto con los estudios teóricos de Griffith, le llevaron a acuñar el término “prion” (del inglés *Proteinaceous Infectious Particle*), para describir e identificar a esta inusual partícula infecciosa causante de las EET y diferenciarlo así de otros patógenos como los virus, bacterias u hongos. Según Prusiner, la partícula infecciosa del scrapie debía contener un componente proteico para la infectividad, ya que era resistente a la inactivación específica de ácidos nucleicos, pero no a los métodos de inactivación de proteínas [55]. Al mismo tiempo, Bolton y colaboradores consiguieron aislar grandes cantidades de una proteína que se encontraba en el SNC de los animales infectados y que formaba parte de la fracción infecciosa de las muestras. Esta proteína tenía un tamaño de 27-30 kDa y era resistente a la digestión por proteinasa K (PK) [56]. A inicios de la misma década, Patricia Merz y colaboradores fueron los primeros en observar estructuras fibrilares anormales en muestras procedentes de cerebros infectados con scrapie, CJD y kuru mediante el uso de microscopía electrónica y tinción negativa, pero las clasificaron erróneamente como virus filamentosos (Figura 2) [57-59]. Al mismo tiempo, Prusiner y colaboradores fueron también capaces de observar las mismas estructuras y las denominaron varillas del prion (*prion rods* en inglés), proponiendo que pudiera tratarse de estructuras amiloides relacionadas con los agregados presentes en los encéfalos de pacientes. También relacionaron por primera vez estas estructuras filamentosas con el agente infeccioso y demostraron que estaban compuestas exclusivamente de lo que ellos denominaron proteína del prion (PrP, del inglés, *Prion Protein*), que era parte importante, sino única, del agente causal de las EET [60]. Esta proteína del prion se denominó PrP²⁷⁻³⁰ debido a su tamaño y se vinculó directamente con la infectividad.

Tras determinar la naturaleza proteica de la partícula infecciosa, la siguiente cuestión que trataba de dilucidar la comunidad científica era determinar el origen o la fuente del agente infeccioso. El grupo de Prusiner aisló y secuenció la región de la parte amino terminal (N-terminal) de la PrP²⁷⁻³⁰ en 1984 [61]. Basado en la secuencia N-terminal obtenida por Prusiner, Chesebro consiguió aislar y secuenciar un RNA mensajero (RNAm) que codificaba la PrP²⁷⁻³⁰. Sorprendentemente, este transcrito se encontraba en encéfalos de animales enfermos y sanos, lo que sugería que esta proteína podría ser un constituyente normal del cerebro de ratones y hámsteres [62]. Todo esto llevó a Oesch y colaboradores a descubrir que la proteína del prion estaba codificada en un gen de copia única y que dicha proteína era parte de una proteína mayor de unos 33-35 kDa [63]. Finalmente, en 1986 el grupo de Charles Weissmann demostró que el RNAm que codifica la proteína del prion era el producto del gen llamado *PRNP* que se expresaba de manera constitutiva en el cerebro de animales sanos, así como en otros tipos celulares. Estos estudios demostraron que la PrP²⁷⁻³⁰, también conocida como PrP^{Sc} (isoforma PrP

scrapie, por su asociación con el scrapie) y la PrP de 33-35 kDa descubierta en individuos sanos, llamada PrP^C (isoforma PrP celular, no asociada a la enfermedad) estaban codificadas en el mismo gen cromosómico [64].

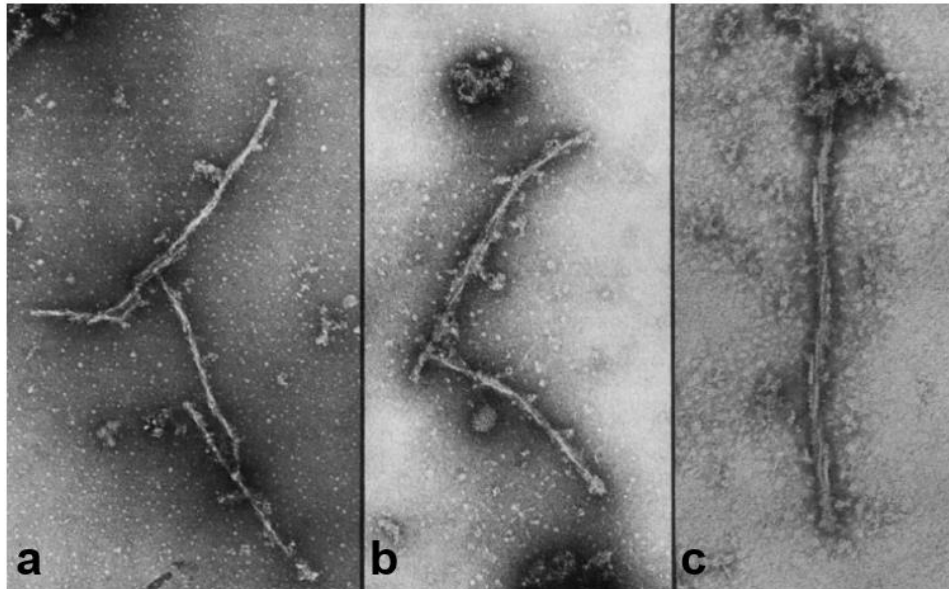


Figura 2. Imágenes de microscopía electrónica de campo oscuro de las fibras de PrP asociadas a las EET. a) Microfotografía de campo oscuro en la que se pueden observar las varillas del prion formadas por PrP^{Sc} de un cerebro de hámster infectado con CJD; **b)** de un cerebro humano afectado por CJD y **c)** de un cerebro de ratón infectado con la cepa de scrapie 139A. Barra de escala de 1000 nm. (Modificado de [58]).

La hipótesis de “solo proteína” surge de la puesta en común de todas las evidencias y descubrimientos realizados en la década de los 80, cuyo máximo exponente fue Prusiner. Esta hipótesis, ampliamente respaldada por la comunidad científica hoy en día, propone que el único componente del agente infeccioso causante de las enfermedades priónicas es la PrP^{Sc}, una isoforma malplegada y patogénica de la PrP^C, que a diferencia de la PrP^C presenta un plegamiento nativo no relacionado con la enfermedad. El mecanismo por el cual se produce la conversión de PrP^C a su isoforma patogénica PrP^{Sc} sigue siendo desconocido hasta la fecha. Han sido propuestos varios modelos para explicar dicho mecanismo de conversión, los cuales serán discutidos en apartados posteriores. Así, los primeros estudios indicaron que ambas isoformas estaban codificadas en un mismo gen y RNAm, por lo que presentaban la misma secuencia aminoacídica. Esto llevó a explicar las diferencias entre ambas a través de las modificaciones post-traduccionales de la PrP^C [65, 66]. Sin embargo, dado que los estudios de las modificaciones covalentes post-traduccionales no revelaron diferencias entre la PrP^C y la PrP^{Sc} [67], se propuso que la PrP^{Sc} actúa como molde catalizando la conversión de la PrP^C a PrP^{Sc} mediante un cambio conformacional y que las diferencias entre ambas isoformas podrían deberse únicamente a diferencias en su conformación. Así, en 1991, Caughey y colaboradores demostraron mediante el uso de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier

(FTIR, del inglés, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) que la PrP²⁷⁻³⁰, la forma truncada de la PrP^{Sc}, estaba compuesta fundamentalmente por láminas-β (47%), lo que era consistente con sus propiedades amiloidogénicas [68]. Posteriormente, Gasset y colaboradores demostraron que la PrP²⁷⁻³⁰ presenta una alta proporción de lámina-β (54%) y que la estructura secundaria de esta isoforma se ve alterada, disminuyendo la cantidad de láminas-β, bajo condiciones que alteran la infectividad del scrapie. Así pues, correlacionaron los cambios estructurales secundarios con alteraciones en la infectividad [69]. Finalmente, en el mismo año se demostró mediante FTIR que la conversión PrP^C a PrP^{Sc} está asociada con un aumento de la proporción de láminas-β en detrimento de las hélices-α características de la PrP^C, demostrando así que un cambio conformacional era el responsable de la conversión de la isoforma celular a la isoforma infecciosa [70]. Este cambio conformacional le confería nuevas propiedades bioquímicas a la isoforma infecciosa PrP^{Sc}, como por ejemplo la insolubilidad en detergentes no iónicos [71] o la resistencia parcial a la digestión por PK [72]. Esta última propiedad es de gran importancia dado que permite diferenciar la PrP^C, de 33-35 kDa, de la PrP^{Sc}, de 27-30 kDa; esta proteasa digiere aproximadamente los 90 primeros aminoácidos de la PrP^{Sc}, dando lugar a la formación de un núcleo resistente de 27-30 kDa distinguible de la PrP^C mediante electroforesis. Otra característica importante relacionada con el cambio conformacional es el aumento de la proporción de láminas-β, lo que explicó la tendencia a la agregación de la isoforma infecciosa en fibras amiloides, cuya acumulación genera diferentes tipos de depósitos en los cerebros de los individuos afectados [73]. Hasta la fecha, la detección de estos agregados formados por PrP^{Sc} resistente a PK mediante anticuerpos anti-PrP constituye el único marcador patognomónico para el diagnóstico de las enfermedades priónicas. Sin embargo, el descubrimiento y descripción de la VPSPr, la cual se caracteriza por presentar una isoforma de la PrP^{Sc} sensible a PK [33], desafía la utilidad de la PrP^{Sc} como marcador inequívoco para el diagnóstico de las EET.

Por último, la identificación de mutaciones asociadas a formas familiares de la enfermedad gracias al descubrimiento del gen de la PrP supuso otro fuerte respaldo a la hipótesis de “solo proteína”. La primera mutación que se relacionó con una enfermedad priónica, en concreto con el GSS, fue la sustitución de una prolina por una leucina en la posición 102 de la secuencia de aminoácidos (P102L) de la PrP humana por parte de Hsiao y colaboradores en 1989 [30]. Desde entonces, se han descrito más de 50 mutaciones (inserciones, deleciones, repeticiones y sustituciones) relacionadas con las EET de origen genético, lo que representa alrededor del 10-15% de todas las enfermedades priónicas. El resto de prionopatías son de origen esporádico o adquiridas [74].

1.4. Confirmación de la hipótesis de “solo proteína”

Los apoyos y evidencias a favor de la hipótesis de “solo proteína” no solo surgen después de su formulación. Si echamos la vista atrás, podemos corroborar que desde los años 20 existen pruebas que refuerzan esta controvertida hipótesis. Mucho antes del desarrollo de la biología molecular moderna, en los años 20, ya se conocía el componente familiar o hereditario de la CJD [20]. Años más tarde, en la década de los 60 y 70, Dickinson y colaboradores durante sus estudios con diferentes aislados de scrapie y diferentes cepas de ratones consiguieron aislar un gen que controlaba el periodo de incubación en cada ratón inoculado con una cepa particular de scrapie. A este gen lo denominaron *Sinc* (del inglés, *Scrapie incubation*). En ovejas también fue descubierto este gen y se denominó *SIP* (del inglés, *Shorter incubation period*) [75]. Estos hallazgos iniciaron los experimentos que culminarían en el desarrollo del concepto de barrera de transmisión entre especies, introducido por Pattison y colaboradores en la década de los 60 con sus experimentos de transmisión del scrapie de ovejas a cabras [76, 77]. La relación del concepto de barrera de transmisión con diferencias en la dotación genética del huésped y no solo con diferencias en la dotación genética del agente infeccioso gracias al descubrimiento de los genes *Sinc* y *SIP*, fue considerada inicialmente como una prueba a favor de que el agente causal del scrapie contenía material genético. El descubrimiento por parte de Carlson y Prusiner del locus que contenía el gen de la PrP^C y su estrecha relación con el locus del gen *Sinc* volvió a decantar la balanza a favor de la hipótesis de “solo proteína”. Ellos llamaron Prn-p al locus del gen de la PrP^C y Prn-i al locus del gen *Sinc* [78]. Finalmente, Manson y Moore demostraron que los polimorfismos de Prn-p controlaban los tiempos de incubación en ratones inoculados con scrapie, quedando demostrado que en realidad Prn-p y Prn-i eran el mismo gen [79].

1.4.1. Los estudios con modelos animales apoyan la hipótesis de “solo proteína”

Uno de los avances más importantes en la comprensión de la barrera de transmisión entre especies, así como en los mecanismos de propagación y distribución de los priones por el SNC fue el desarrollo de modelos murinos transgénicos. Los primeros estudios de transmisión de la enfermedad se llevaron a cabo en ovejas, cabras y primates [14, 77, 80] y probaron la transmisibilidad de las EET, además de proporcionar modelos animales para el estudio de dichas enfermedades. La transmisión y adaptación del scrapie a ratones WT por parte de Chandler [48] supuso un avance significativo en el campo de las enfermedades priónicas, ya que proporcionó el primer modelo *in vivo* apto para la experimentación sistemática en laboratorios, facilitando la investigación de las EET durante las siguientes décadas. Sin embargo, aun eran necesarios modelos animales que expresasen la PrP^C de diferentes especies para lograr una mayor comprensión de los fenómenos relacionados con las enfermedades priónicas. En 1989, años más tarde de la obtención del primer ratón transgénico [81],

se generó el primer modelo murino transgénico en el campo de los priones. DeArmond y colaboradores demostraron que el modelo que habían creado expresaba el transgén que codifica la PrP^C del hámster sirio dorado, lo que supuso un hecho sin precedentes para el estudio de los fenómenos de barrera de transmisión y cepas de priones. Consiguieron por primera vez demostrar inequívocamente la importancia de la secuencia de aminoácidos del gen de la PrP^C del huésped para la susceptibilidad a las cepas de priones, ya que los nuevos ratones transgénicos mostraron los rasgos característicos de la infección por scrapie en hámsteres [82].

Otro de los grandes respaldos a la hipótesis de “solo proteína” fue la generación de un ratón que expresaba el transgén murino equivalente a la mutación P102L asociada al GSS por parte de Hsiao y colaboradores [83]. Demostraron que solo se requería una mutación puntual en el gen *PRNP* para el desarrollo de una enfermedad espontánea similar al GSS en humanos. Sin embargo, esta enfermedad no era transmisible a ratones WT, sino que solo aceleraba la aparición de los signos en el mismo modelo de sobreexpresión [84]. La generación de ratones a los cuales se les había suprimido la expresión del gen *PRNP* (*PRNP*^{-/-}) fue de gran ayuda no solo para la validación de la hipótesis de “solo proteína”, ya que además de demostrar que la proteína priónica endógena del huésped era necesaria para la infección, sentó las bases para la generación de modelos murinos transgénicos sin interferencia con la proteína endógena del huésped. Estos ratones *knock-out* (KO) eran resistentes a la infección por scrapie y no mostraban los signos clínicos de la enfermedad ni acumulación de PrP^{Sc} en sus encéfalos [85], confirmando que la acumulación de PrP^{Sc} en el cerebro se debe a la conversión de la PrP^C. Años después, la generación de ratones hemocigotos para el gen de la *PRNP* (*PRNP*^{+/-}), es decir que solo expresan una copia del gen, demostró que el nivel de expresión de la PrP^C está directamente relacionado con la tasa de acumulación de PrP^{Sc} e inversamente relacionado con los tiempos de incubación, dado que estos modelos mostraron tiempos de incubación de la enfermedad más largos que los ratones homocigotos (*PRNP*^{+/+}) [86]. Por el contrario, la generación de modelos murinos que sobreexpresan el gen de la proteína priónica mostraban tiempos de incubación más cortos lo cual también supuso un hallazgo a favor de la hipótesis de “solo proteína” [87, 88].

La generación de una gran variedad de modelos murinos transgénicos facilitó la transmisión de diferentes enfermedades priónicas asociadas a mutaciones, así como demostró inequívocamente que una mutación puntual en la PrP^C es suficiente para la aparición de una EET. Entre ellos podemos destacar el modelo de ratón transgénico que expresa la PrP^C bovina con una mutación asociada al GSS en humanos [89], el modelo murino transgénico que expresa la PrP^C de ratón con mutaciones asociadas a CJD y GSS [90] y el modelo de ratón transgénico que expresa la PrP^C del topillo rojo (*Myodes glareolus*), la cual presenta un polimorfismo natural (109I) que favorece su malplegamiento espontáneo [91].

1.4.2. Los modelos *in vitro* generados respaldan la hipótesis de “solo proteína”

A pesar de que se disponía de evidencias cada vez más sólidas sobre la validez de la hipótesis enunciada por Prusiner, todavía existían detractores de la misma. El desarrollo de técnicas *in vitro* que mimetizan la enfermedad o ciertos aspectos de la misma, y que analizaremos en profundidad en un apartado posterior, ayudó a que la hipótesis de “solo proteína” fuese aceptada por la mayoría de la comunidad científica, además de suponer un gran avance en el modelado y estudio de las EET. La prueba definitiva se estableció con la generación de priones *in vitro* a partir de únicamente PrP^C y después de que estos indujesen una enfermedad priónica en modelos animales WT. La primera técnica encaminada a este propósito fue desarrollada por Caughey y colaboradores y se conoce como ensayo de conversión libre de células (del inglés, *cell-free conversion assay*). Con esta técnica los autores demostraron que la PrP^{Sc} purificada de cerebros de hámsteres infectados con scrapie inducía la conversión de la PrP^C purificada a la isoforma resistente a PK [92]. Esta fue la primera demostración mediante el uso de un sistema *in vitro* de que el malplegamiento de la PrP^C estaba catalizado únicamente por la presencia de PrP^{Sc}. Sin embargo, esto no fue suficiente para demostrar fehacientemente la hipótesis de “solo proteína” ya que se obtuvo un bajo rendimiento y en condiciones no fisiológicas, que junto con el exceso de PrP^{Sc} necesario para la conversión dificultó mucho la evaluación de la infectividad de la nueva PrP malplegada generada *in vitro*. En el año 2001 se consiguió la conversión más eficiente y rápida de una gran cantidad de PrP^C mediante al uso de una cantidad mínima de PrP^{Sc} [93]. Esto supuso los inicios de una de las técnicas *in vitro* más extendidas en el campo de los priones, la amplificación cíclica de proteínas malplegadas o PMCA (del inglés, *Protein Misfolding Cyclic Amplification*). Esta técnica, a través de la aplicación de ciclos de sonicación e incubación, consigue la conversión de grandes cantidades de PrP^C que es utilizada como sustrato mediante el uso de cantidades ínfimas de PrP^{Sc}, la cual actúa como semilla iniciadora de la conversión. Este procedimiento mimetiza lo que ocurre en el SNC de los individuos afectados, generando una gran cantidad de PrP^{Sc} a partir de PrP^C *in vitro*, pero con una cinética acelerada. Los priones obtenidos mediante PMCA mantienen las mismas características biológicas, estructurales y bioquímicas que la semilla de PrP^{Sc} iniciadora de la conversión [94]. Este hecho supuso para muchos la confirmación de la hipótesis de “solo proteína” y la demostración de que los priones pueden propagarse de forma indefinida a expensas de suficiente PrP^C y de que la nueva PrP^{Sc} generada durante el proceso es capaz de inducir su mismo malplegamiento a la PrP^C en un proceso autocatalítico de conversión. No obstante, el uso de PrP^C y PrP^{Sc} proveniente de encéfalos de animales fue el argumento empleado por los detractores de la hipótesis de “solo proteína”; era necesario demostrar que se podía generar nueva PrP^{Sc} utilizando únicamente proteína priónica pura, sin ningún otro componente añadido. Esta demostración se realizó en el año 2004, cuando Legname y colaboradores fueron capaces de obtener

in vitro fibras amiloides *de novo*, en ausencia de PrP^{Sc} como semilla. Para estos experimentos utilizaron PrP producida en *Escherichia coli* (*E. coli*), evitando así la utilización de componentes con origen encefálico. Tanto las fibras producidas *de novo* como las generadas utilizando como semilla dichas fibras fueron infecciosas en modelos animales que sobreexpresaban la PrP^C de ratón, aunque con tiempos de incubación más largos que los priones provenientes de encéfalos de animales enfermos [95]. Sin embargo, al igual que ocurrió con la PMCA, los escépticos argumentaron que como estas fibras generadas *de novo* eran infectivas únicamente en ratones que sobreexpresan la proteína priónica y no en ratones WT, y dado que los animales con sobreexpresión manifestaban la enfermedad de forma espontánea por un exceso de PrP^C en sus cerebros, las fibras *de novo* únicamente estaban acelerando la aparición de la enfermedad espontánea y no induciendo una enfermedad priónica.

La demostración definitiva llegaría con la generación *in vitro* de priones *de novo* que fueran capaces de infectar a animales de genotipo silvestre. Así, Makarava y colaboradores en 2010 fueron capaces de obtener fibras amiloides *de novo* utilizando PrP de hámster producida en *E. coli* y utilizando un sistema de fibrilización *in vitro* diferente al usado por Legname. Estos priones *de novo* fueron capaces de infectar hámsteres de genotipo WT, pero fue necesaria una segunda inoculación en los mismos animales para hacer patente la enfermedad priónica [96]. Aun así, los escépticos con la hipótesis de “solo proteína” consideraron también insuficientes estos experimentos. En el mismo año, Kim y colaboradores obtuvieron priones utilizando la técnica de PMCA con PrP^C purificada de *E. coli* como sustrato y PrP^{Sc} de encéfalos, por lo que tampoco se consideró una demostración completamente válida [97]. Sin embargo, también en 2010, el grupo de Ma obtuvo mediante PMCA priones recombinantes *de novo* sin la adición de ningún tipo de PrP^{Sc}. El sustrato de PMCA solo contenía PrP de ratón producida en *E. coli*, RNA y lípidos como cofactores [98]. Los priones *de novo* obtenidos de esta forma mostraron una alta infectividad en ratones WT, aunque la enfermedad que originaban presentaba características ligeramente diferentes a las enfermedades priónicas conocidas. De esta forma, al haber obtenido priones infecciosos sin la necesidad de utilizar PrP^{Sc} como semilla u otros componentes de origen encefálico y al haber inducido estos una enfermedad priónica en ratones de genotipo silvestre, la mayoría de la comunidad científica catalogó este hito como la demostración definitiva de la hipótesis enunciada por Prusiner en el año 1982, donde postulaba el carácter exclusivamente proteico del agente causal de las EET [99].

Todas estas demostraciones han llevado a que la discusión acerca de la naturaleza del agente infeccioso haya sido zanjada. Uno de los argumentos en contra de la hipótesis de “solo proteína” era la existencia de diferentes cepas de priones, cada una de las cuales presentan diferentes tiempos de incubación y rasgos histopatológicos característicos. En el caso de otras enfermedades infecciosas, la existencia de serotipos o cepas diferentes se relaciona directamente con cambios en el material

genético del agente causal de la enfermedad. Al defender la hipótesis de “solo proteína” la naturaleza exclusivamente proteica del agente infeccioso de las EET, los detractores de la misma argumentaban que la existencia de cepas de priones no está en concordancia con lo que postula la hipótesis. Sin embargo, la ausencia de material genético en la entidad infecciosa responsable de las EET y la existencia de cepas se podría explicar por variaciones en el estado conformacional de la PrP^{Sc} que surge durante el proceso de conversión autocatalítico [100, 101]. Existen diversos experimentos que respaldan esta posibilidad: i) la PMCA es capaz de reproducir y mantener las características de la PrP^{Sc} utilizada como semilla [102], ii) compuestos de diferente naturaleza interactúan de forma diferencial con cada cepa debido a las variaciones estructurales [103] o iii) la existencia de diferencias estructurales entre cepas utilizando técnicas biofísicas [104-106]. El descubrimiento a mediados de los años 90 de lo que se conoce hoy en día como priones de levaduras y de otras proteínas que actúan mediante mecanismos similares en una gran variedad de organismos, ayudó a reforzar la validez de la hipótesis de “solo proteína”. En 1994, Wickner y colaboradores describieron dos proteínas fúngicas, Ure2 y Sup35, que actúan como elementos de transmisión de información biológica durante la división celular. Estas dos proteínas forman parte de un grupo más extenso al que se conoce como priones de levaduras, ya que mediante un mecanismo aún no del todo descrito, son capaces de adquirir una conformación específica diferente a la nativa e inducir la misma conformación en otras proteínas del mismo tipo, transmitiendo así la información. Esta conversión de tipo priónica, a diferencia de los priones en humanos, no está asociada a efectos patogénicos sino que suele formar parte de mecanismos para modular la actividad metabólica de las levaduras sin la necesidad de cambios en el material genético [107]. A partir de estos descubrimientos se han descrito una gran variedad de proteínas que actúan a través de un mecanismo de tipo priónico. Por ejemplo, en 2003 se descubrió la proteína CPEB (del inglés, *Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding protein*) en *Aplysia californica*, una babosa marina. Esta proteína está relacionada con procesos de traducción del RNAm durante procesos de plasticidad sináptica y formación de memoria. Su acción la ejerce a través de un cambio conformacional y la inducción del mismo a proteínas CPEB cercanas [108]. Las proteínas MAVS (del inglés, *Mitochondrial AntiViral Signaling*) fueron descritas en 2011 en cultivos celulares de origen humano y juegan un papel en la respuesta a ataques virales. Su mecanismo de acción es similar al de los priones, actuando mediante un cambio conformacional autocatalítico, lo que parece indicar que estos mecanismos no son únicos de las EET y no siempre están relacionadas con enfermedad [109]. Así, diversos estudios indican hoy en día que la capacidad inherente de las proteínas para la agregación y formación de amiloides puede constituir una ventaja evolutiva en ciertos organismos y no siempre estarían relacionadas con procesos patológicos, encontrándose estos repartidos por todos los reinos de la vida. En la actualidad se han descrito secuencias de proteínas que predisponen para la agregación y formación de fibras amiloides, surgiendo el concepto de amiloides funcionales, los cuales confieren

a los organismos que los presentan ciertas funciones biológicas como las expuestas anteriormente [110, 111]. Por tanto, la existencia de proteínas cuya función se ejerce a través de mecanismos similares a los priones supone otro importante apoyo a la hipótesis de “solo proteína”.

A pesar de los grandes esfuerzos y avances logrados en las últimas décadas en el campo de las enfermedades priónicas y la demostración definitiva de la hipótesis de “solo proteína”, aún quedan muchos aspectos de la enfermedad por resolver para lograr una comprensión profunda y completa de la misma. Algunos de los aspectos más importantes que están siendo objeto de intensas investigaciones son por ejemplo la determinación del mecanismo molecular de conversión subyacente a todas las EET, la determinación de la estructura tridimensional de la PrP^{Sc}, el estudio de la posible implicación de cofactores que participen en la conversión de PrP^C a PrP^{Sc}, así como comprender los fenómenos de cepas de priones y barrera de transmisión entre especies.

2. Biología de los priones

2.1. El gen *PRNP*

El gen que codifica la proteína del prion fue descubierto y clonado a finales de la década de los 80, quedando demostrado que tanto la PrP^C como la PrP^{Sc} están codificadas en el mismo gen [64]. Este gen, denominado *PRNP*, es un gen de copia única y su marco de lectura abierto (ORF, del inglés *Open Reading Frame*) está contenido en un solo exón en todas las especies de mamíferos y aves en las que se ha estudiado. Sin embargo, el gen contiene uno o dos exones más, según la especie, en los que se encuentran regiones no codificantes que incluyen el promotor y los sitios de terminación. Este gen se localiza en el brazo corto del cromosoma 20 en humanos o en la región homóloga del cromosoma 3 en ratones. El gen *PRNP* se encuentra altamente conservado dentro de los mamíferos, lo que sugiere que algunas de las funciones de la PrP^C son importantes [112]. Además, se han descrito homólogos en otros vertebrados que varían del gen *PRNP* en términos de secuencia pero que presentan motivos estructurales similares, como es el caso del pollo (*Gallus gallus*), tortuga (*Trachemys scripta*) y rana (*Xenopus laevis*), cuya similitud de secuencia con las PrP de mamífero es aproximadamente del 30% [113].

El gen *PRNP* se expresa de forma constitutiva y ubicua en todo el organismo, presentando características comunes a los genes constitutivos o *housekeeping*, como por ejemplo una región rica en guaninas (G) y citocinas (C) que constituyen una caja GC, que se trata de un sitio de unión canónico para los factores de transcripción humanos Sp1, AP-1 y AP-2, entre otros muchos, los cuales controlan la expresión génica en diversos tejidos. Los factores de transcripciones relacionados con el gen *PRNP* permiten modular además la expresión de la PrP^C ante situaciones determinadas, como por ejemplo

la señalización por factores de crecimiento o por elementos de estrés, como el estrés oxidativo o estrés genotóxico [114]. Este gen se expresa desde etapas tempranas de la embriogénesis en la mayoría de los tejidos, alcanzando su expresión máxima en los tejidos neuronales, como son el cerebro, cerebelo e hipotálamo durante la etapa adulta. Se ha detectado expresión de PrP^C en corazón, músculo esquelético, intestinos, útero y testículos, además de células del sistema inmunitario, en células madre hematopoyéticas y compartimentos linfoides y mieloides [115].

2.2. PrP^C

La PrP^C es una glicoproteína de unión a membrana que se sintetiza inicialmente como una proteína precursora de aproximadamente 250 aminoácidos según la especie que se considere. Esta proteína precursora presenta en su extremo amino terminal (N-terminal) un péptido señal de 22 aminoácidos [67] que es reconocido por el retículo endoplasmático rugoso (RER) para ser translocado cotraduccionalmente hacia el lumen, gracias a la acción de una translocasa. Así, la traducción comienza con la síntesis de este péptido señal y seguidamente la translocasa lo orienta hacia el interior del RER para continuar con la traducción e iniciar el procesamiento de la proteína. Este procesamiento implica la eliminación del péptido señal del extremo N-terminal, la formación de un puente disulfuro entre dos residuos de cisteínas (cisteínas 179 y 214 en humanos) esencial para su estabilidad y la glicosilación de hasta dos asparaginas (asparaginas 181 y 197 en humanos) [116]. El final del proceso de traducción consiste en la adición de una molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI) al extremo carboxi terminal (C-terminal) de la proteína que sirve como anclaje a la membrana plasmática [117]. Es un proceso común en las células eucariotas, donde el 10-20% de proteínas de membrana presentan este tipo de anclaje. Consiste en la eliminación de un péptido señal hidrofóbico de 22-23 aminoácidos del extremo C-terminal y la unión de un GPI preformado, mediante un proceso complejo y poco conocido hasta la fecha, en el que están implicadas más de 20 enzimas. La unión de GPI-proteína se da a través de una reacción de transamidación catalizada por una transamidasa multimérica en el que quedan unidas la proteína y el GPI y se elimina el péptido señal del extremo C-terminal. El GPI de la PrP^C presenta una estructura común a los GPI de las demás proteínas de membrana, formado por una etanolamina fosfato unida al carboxilo terminal de la proteína mediante un enlace amida, un núcleo glicano altamente conservado de tres residuos de manosa, glucosamina, un grupo fosfatidilinositol y colas fosfolipídicas que anclan el GPI a la membrana (Figura 3) [118]. Sin embargo, desde la caracterización inicial del GPI de la PrP^C se sabe que este está al menos parcialmente sializado [119], una característica poco común de los GPI, siendo la PrP^C una de las 3 proteínas de membrana que presentan ácido siálico en su estructura. Estudios recientes parecen indicar que la presencia de ácido siálico afecta a la localización y función de la PrP^C [120, 121] y que el nivel de sialización de la PrP^C de mamíferos es

dependiente del huésped, tejido y tipo celular considerado [122]. Finalmente, la PrP^C madura es transportada a la membrana plasmática a través del aparato de Golgi y se localiza fundamentalmente en balsas lipídicas, que son microdominios dinámicos ricos en colesterol y esfingolípidos, quedando orientada hacia el compartimento extracelular [123]. La PrP^C puede sufrir procesos de endocitosis mediante mecanismos dependientes e independientes de clatrina, por lo que se encuentra sometida a proceso de reciclado y degradación constitutivos [124, 125].

Tras la traducción y procesamiento de la PrP^C, la eliminación de ambos péptidos señales tiene como resultado una proteína madura de aproximadamente 210 aminoácidos (208 aminoácidos en humanos: aminoácidos 23-230 de la proteína precursora) y un peso molecular alrededor de 26-37 kDa según el estado de glicosilación que presente. La PrP^C se compone de dos dominios estructuralmente diferenciados de aproximadamente el mismo tamaño; un dominio N-terminal desestructurado y una región globular C-terminal [114]. El extremo N-terminal de la proteína madura se extiende desde el aminoácido 23 al 124 en humanos y se trata de un dominio desestructurado y flexible según los datos obtenidos por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) [126, 127]. Está compuesto por dos pequeñas regiones cargadas positivamente (CC, del inglés *Charged Cluster*) denominadas CC1 (aminoácidos 23-27) y CC2 (aminoácidos 95-110), implicadas en procesos de endocitosis durante el tráfico intracelular [128]. Ambas regiones polibásicas se encuentran flanqueando una región denominada zona de octa repeticiones (OR, del inglés *Octapeptide Repeats*). Esta región de OR se caracteriza por estar compuesta por 4, 5, 6 o 7 repeticiones, variando en número según la especie, de una secuencia variable de 8 aminoácidos (siendo la secuencia PHGGGWGQ una de las más habituales) y está altamente conservada en todos los mamíferos [129, 130]. Muchas investigaciones se han centrado en la zona de OR, ya que además de existir evidencias que le otorgan un papel importante en la función fisiológica de la PrP^C, se han descrito formas genéticas de las EET asociadas a expansiones o deleciones de las OR, denominada OPRI (del inglés *Octapeptide Repeat Insertions*) y OPRD (del inglés *Octapeptide Repeat Deletions*), respectivamente [74]. Una de las funciones más importantes relacionados con las propiedades de la zona de OR es su capacidad de unir cationes bivalentes, destacando entre ellos el Cu²⁺ y el Zn²⁺ [131-133]. Además, también se ha demostrado que esta zona de OR tiene tendencia a la agregación [130] y por tanto podría jugar un papel importante en la patología. En presencia de Cu²⁺ las OR tienen la capacidad de interactuar con el heparán sulfato [134] y diversos estudios han demostrado que la agregación proteica puede estar catalizada, acelerada o potenciada por moléculas polianiónicas, como los glicosaminoglucanos, entre los que se encuentra el heparán sulfato [135]. A continuación, conectando el dominio desestructurado N-terminal y la región globular C-terminal hay una región hidrofóbica conocida como HC (del inglés, *Hydrofobic Core*).

El dominio globular de la proteína se localiza en la zona C-terminal y se trata de una región con un alto grado de conservación estructural entre mamíferos. A pesar de la baja identidad de secuencia entre mamíferos y otros vertebrados, de tan solo el 30%, los motivos estructurales principales se encuentran altamente conservados entre ellos. Este dominio globular se encuentra formado por tres hélices- α y dos pequeñas regiones de hoja- β antiparalelas, que flanquean la primera de las hélices- α . Las otras dos hélices- α se encuentran a continuación de la segunda hoja- β [113]. En este dominio globular existen además pequeños giros que conectan motivos estructurales secundarios. De especial importancia es el giro β 2- α 2, el cual conecta la hoja- β número 2 con la hélice- α número 2, ya que existen evidencias directas de su posible implicación en la aparición de las EET y el fenómeno de barrera de especie [136, 137]. Este giro, que se extiende desde el aminoácido 165 hasta el 175 en humanos, es una zona de alta diversidad estructural y polimórfica, el cual según su secuencia primaria puede formar un giro rígido (RL, del inglés *Rigid Loop*) bien definido o puede ser estructuralmente desordenado, lo que lo convierte en una región crítica de la PrP^C con un rol importante en la aparición y desarrollo de las enfermedades priónicas [138]. En el dominio globular se localizan los dos residuos de cisteínas (aminoácidos 179 y 214 en humanos) implicados en la formación de un puente disulfuro, esencial para la estabilidad de la proteína, y los dos residuos de asparagina (aminoácidos 181 y 097 en humanos) susceptibles de ser N-glicosilados. La adición de N-glicanos en estos dos residuos da lugar a la formación de PrP^C diglicosilada, monoglicosilada y no glicosilada. El estado de glicosilación de la PrP^C y la proporción de las tres formas varía entre las diferentes especies y sirve para la distinción y caracterización de la PrP^C. Sin embargo, a día de hoy no se conoce la implicación de los N-glicanos en la función de la PrP^C ni en el mecanismo de conversión de la PrP^C a PrP^{Sc}, así como en otras características biológicas de los priones [7]. Cabe destacar que la mayoría de las mutaciones responsables de las EET familiares se localizan en el dominio globular, aunque existen mutaciones en la región N-terminal y en la secuencia peptídica del GPI asociadas a formas familiares atípicas de estas enfermedades [74].

Como hemos mencionado anteriormente, una de las características reseñables de la PrP^C es su anclaje a membrana a través de un GPI, el cual se une a la serina en posición 231 (en humanos) durante el proceso de traducción y maduración. El hecho de que las proteínas de unión a membrana mediante anclaje de GPI estén implicadas en una gran variedad de funciones fisiológicas no arroja luz sobre las posibles funciones de la PrP^C [118]. Sin embargo, su implicación en el desarrollo de la enfermedad ha sido demostrada en numerosas ocasiones. En primer lugar, se ha observado que la localización de la PrP^C en balsas lipídicas gracias al GPI es importante para la conversión priónica, ya que la perturbación de estos microdominios mediante el uso de compuestos, como por ejemplo la Anfotericina B que secuestra colesterol, reduce o inhibe la formación de PrP^{Sc} [139]. Por otro lado, la expresión de PrP^C

con mutaciones que la dirigen a regiones de la membrana diferentes a balsas lipídicas también reduce la conversión de PrP^C a PrP^{Sc} [140]. Sin embargo, la generación de un modelo transgénico de ratón que expresaba la PrP^C sin GPI demostró que la conversión de PrP^C a PrP^{Sc} tiene lugar aunque la PrP^C, por ausencia del GPI, no se localice en las balsas lipídicas de la membrana plasmática. Los ratones infectados con priones murinos mostraron un retraso en la aparición de los síntomas, junto con alteraciones en las manifestaciones neuropatológicas y clínicas. Cabe destacar que desarrollaban placas amiloides compuestas por PrP^{Sc}, pero mostraban una marcada reducción de la espongirosis, lo que se relacionó con una disminución de la neurotoxicidad [141]. Es importante diferenciar dos eventos independientes existentes en las enfermedades priónicas: la conversión de PrP^C a PrP^{Sc}, llamada propagación, y la neurotoxicidad [142]. Los datos obtenidos por Chesebro y colaboradores parecen indicar que el papel del GPI es importante para el desarrollo y mantenimiento de la neurotoxicidad y no para la propagación de los priones propiamente dicha. En la misma dirección apuntan los experimentos llevados a cabo por Lewis y colaboradores, que mediante la eliminación química del GPI de priones preformados demostraron que su ausencia no disminuye la infectividad de estos priones al ser inoculados en modelos que sí expresan la PrP^C anclada a membrana por GPI [143]. Por tanto, en conjunto, todos estos hallazgos sugieren que el GPI no tiene un papel clave en la capacidad de inducir el malplegamiento de la PrP^C, pero sí en los efectos neurotóxicos derivados de dicho malplegamiento.

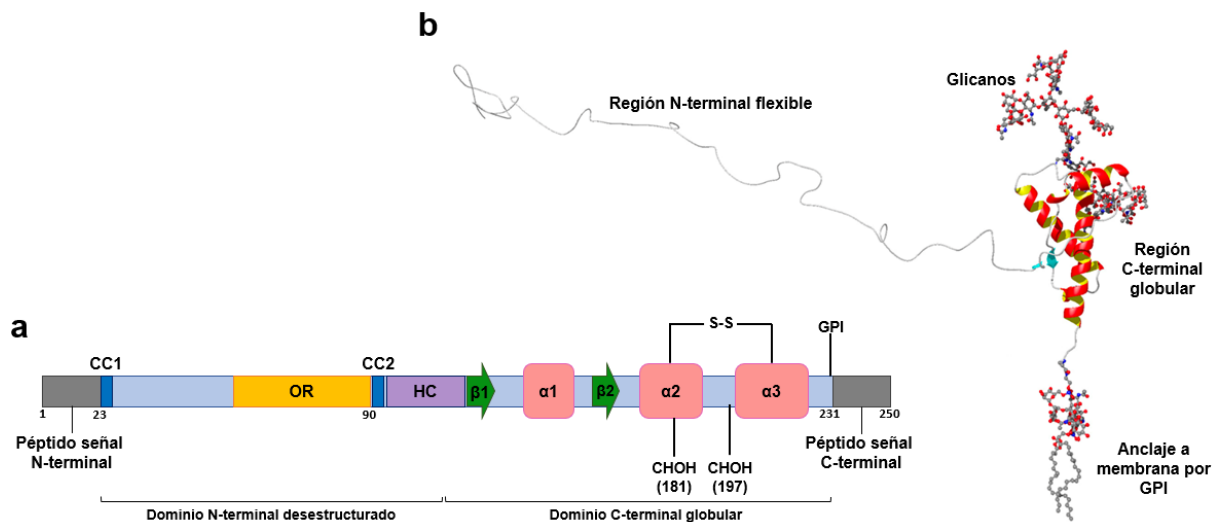


Figura 3. Representación esquemática de la PrP^C y estructura tridimensional de la PrP^C resuelta por RMN. **a)** Representación esquemática de los diferentes dominios de la PrP^C. Los números hacen referencia a la posición del aminoácido. En el dominio N-terminal existe un péptido señal que dirige a la PrP^C hacia la membrana plasmática hasta la posición 23 y es eliminada durante el procesamiento. Flanqueando a la zona de octarepeticiones (OR) se localizan las regiones cargadas positivamente CC1 y CC2, a la cual le sigue la zona rica en aminoácidos con carácter hidrofóbico (HC). En el dominio globular aparecen las dos regiones estructuradas en forma de hojas- β antiparalelas y las tres regiones estructuradas en forma de hélices- α . Dentro de la zona globular también aparecen esquematizados el puente disulfuro entre las posiciones 179 y 214, las asparaginas en las que se apoyan los glicanos, con su posición escrita entre paréntesis y el anclaje a GPI en el aminoácido 231. Por último, se encuentra una región de 19 aminoácidos que codifica el anclaje a GPI. OR: Región de octarepeticiones. HC: Región hidrofóbica. β 1 y β 2: Regiones estructuradas en hoja- β 1 y 2. α 1, α 2 y α 3: Regiones estructuradas en hélice- α 1, 2 y 3. CHOH: Grupo carboxilo de las asparaginas 181 y 197 a los cuales se unen los glicanos. GPI: Anclaje de Glicofosfatidilinositol a la membrana plasmática. **b)** Estructura tridimensional de la PrP^C obtenida mediante RMN. Se puede diferenciar la región N-terminal no estructurada y flexible de la región C-terminal globular y estructurada. Las regiones en hoja- β aparecen de color verde y las regiones en hélice- α aparecen de color rosa. (Imagen **b** modificada de [114]).

A pesar de la gran cantidad de conocimiento generado durante las últimas décadas en relación a la biosíntesis, estructura e implicación en la patología de la PrP^C, las funciones fisiológicas que desempeña o regula siguen siendo desconocidas hoy en día. Su amplia distribución en prácticamente todos los tejidos del organismo y su alto grado de conservación entre mamíferos y gran parte de vertebrados hacen presuponer que esta proteína desempeña una función esencial. Sin embargo, las primeras caracterizaciones de los modelos animales KO para la PrP^C (*PRNP*^{-/-}) no mostraron ningún fenotipo anormal, excepto la resistencia a la infección por priones y alteraciones sutiles del comportamiento en edades avanzadas. Esto parece descartar una función fisiológica relevante o bien indica que su función es redundante o está compensada por otras proteínas [144]. Además de este hecho, existen estudios que indican la necesidad de una PrP^C funcional para la patofisiología de la enfermedad, como los estudios de Chesebro y colaboradores mencionados anteriormente [145]. En esta misma línea se encuentra el experimento donde se implanta en el encéfalo de animales *PRNP*^{-/-} un injerto de tejido que expresa PrP^C y solo este injerto se ve afectado por la neurotoxicidad, a pesar de que los niveles de PrP^{Sc} eran homogéneos en todo el SNC de los animales [146]. Estos estudios parecen indicar que al menos una de las funciones de la PrP^C es la de mediar la neurotoxicidad en las

EET, como se ha visto que también ocurre en la enfermedad de Alzheimer, donde su interacción con el péptido A β parece mediar efectos neurotóxicos. El péptido A β forma agregados amiloides de un modo similar a la PrP^{Sc} y está directamente relacionado con la enfermedad de Alzheimer. Así, el modelo celular N2a *PRNP*^{-/-} ha demostrado ser más resistente a la muerte neuronal provocada por las fibras amiloides del péptido A β . Además, en cultivos celulares que sí expresaban el gen *PRNP*, la adición de PrP recombinante provocaba la unión de las fibras a dicha proteína recombinante evitando la interacción con la PrP^C endógena del cultivo, lo que redujo la muerte celular [147]. Una relación similar se obtuvo con las fibras de α -sinucleína, implicadas en la enfermedad de Parkinson, y la PrP^C [148]. Aun con todos estos resultados, parece poco probable que una proteína tan conservada a lo largo de la evolución en diferentes grupos animales presente como única función mediar la neurotoxicidad de una patología. Desenmascarar la o las funciones fisiológicas de esta proteína no relacionadas con la enfermedad es de vital importancia para alcanzar una mayor comprensión de los mecanismos de neurotoxicidad de las EET y otras enfermedades neurodegenerativas, así como para diseñar nuevas estrategias terapéuticas.

Gracias a la generación de nuevos sistemas, técnicas y modelos, los cuales se unen a las aproximaciones tradicionales en el estudio de las EET, se ha obtenido un extenso repertorio de posibles funciones fisiológicas para la PrP^C. Los estudios en otros modelos como son el pez cebra (*Danio rerio*) o la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) también están ayudando a dilucidar alguna de las posibles funciones de la PrP^C. Así, se ha sugerido que podría estar implicada en la transmisión y plasticidad sináptica, en la formación de memoria, en la estabilización del sueño y el ritmo circadiano, en la excitabilidad neuronal, en la adhesión celular, en neuroprotección, en la actividad y regulación de canales iónicos, en el metabolismo del cobre, hierro y zinc y en el mantenimiento de la mielina periférica, entre muchas otras [144, 149]. Hay que tener en cuenta que muchas de estas funciones han sido identificadas en modelos muy concretos y que existen estudios contradictorios entre sí, por lo que es necesario validarlas para determinar las funciones en las que se encuentra implicada con seguridad. Sin embargo, hay ciertas funciones que cuentan con claras evidencias a su favor, como es el caso de la relación directa de la PrP^C con la cascada en la que se encuentra implicada la proteína Notch. Esta cascada de señalización está relacionada con la formación y desarrollo del tubo neural y se ha demostrado que animales que no expresan la PrP^C presentan alteraciones en la expresión de Notch a lo largo de su desarrollo [150]. Otra de las funciones que cuenta con claras evidencias a su favor es su participación en el mantenimiento de la integridad de la mielina periférica por parte de las células de Schwann. Tras la ablación del gen *PRNP* en distintas cepas de ratones, se observó el desarrollo de una polineuropatía desmielinizante crónica, indicando que la expresión de una PrP^C funcional en neuronas es requisito indispensable para la conservación de la mielina [151, 152].

2.3. Mecanismos de conversión

Uno de los eventos más importantes dentro de los fenómenos implicados en las EET es el mecanismo de conversión de PrP^C a PrP^{Sc} y, sin embargo, al igual que otros muchos aspectos de la patología, sigue siendo desconocido. Independientemente de la dilucidación de las funciones fisiológicas de la PrP^C, de la estructura de la PrP^{Sc} y de las propiedades neuropatológicas de los priones, el evento central de la enfermedad es la conversión autocatalítica y sostenida de la PrP^C a PrP^{Sc} de acuerdo con la hipótesis de “solo proteína”. Lograr un profundo conocimiento y comprensión de este mecanismo molecular se ha convertido en uno de los grandes retos dentro del campo de los priones. Se han propuesto principalmente dos mecanismos (*vide infra*) para explicar el evento de conversión y desde la formulación de ambos, se han conseguido pocos avances hasta la fecha; en gran parte porque la estructura terciaria y cuaternaria de la PrP^{Sc} siguen sin resolverse [114].

Según la hipótesis de “solo proteína”, la PrP^C endógena sufre un cambio conformacional que la transforma en PrP^{Sc} y esto puede ser debido a la presencia de mutaciones asociadas a formas genéticas de la enfermedad, por mutaciones somáticas que desestabilizan la PrP^C y aumentan su tendencia al malplegamiento, por un fenómeno espontáneo de malplegamiento en ausencia de mutaciones que ocurre con muy baja frecuencia o por la presencia de PrP^{Sc} exógena como ocurre en el caso de las formas adquiridas de la enfermedad. La PrP^{Sc} generada es capaz de inducir el malplegamiento de más moléculas de PrP^C, lo que provoca un aumento de la isoforma patogénica. Este proceso de propagación autocatalítico es el responsable de la acumulación de PrP^{Sc} en forma de agregados que en ocasiones derivan a fibras amiloides, que a su vez se pueden organizar en forma de placas en el encéfalo de los individuos afectados [7]. Existen diferencias tanto estructurales como bioquímicas que permiten diferenciar entre PrP^C y PrP^{Sc}. En primer lugar, encontramos diferencias en la estructura secundaria de ambas. Así, la PrP^C está formada por aproximadamente un 40% de hélice- α y un 3% de hoja- β , siendo el resto zonas desestructuradas o giros como se ha explicado anteriormente. Por el contrario, la estructura secundaria de la PrP^{Sc} presenta una ausencia total de hélice- α y aproximadamente un 75% de hoja- β , siendo el resto zonas desestructuradas o giros [153]. En segundo lugar, otras características que diferencian la PrP^{Sc} de la PrP^C es su insolubilidad en detergentes no iónicos [71] y su resistencia parcial a la digestión por PK [72], ambas normalmente utilizadas para la diferenciación, identificación y purificación de la PrP^{Sc}. Tras el tratamiento con PK de la PrP^{Sc} se forma un núcleo de aproximadamente 27-30 kDa como consecuencia de la eliminación de los primeros 90 aminoácidos (aproximadamente) dependiendo de la especie y cepa de prion [154]. Silveira y colaboradores desagregaron parcialmente muestras de PrP^{Sc} y las fraccionaron de acuerdo al tamaño de las partículas, las cuales posteriormente inocularon en hámsteres, demostrando que las partículas más infecciosas eran las que presentaban un peso molecular de 300-600 kDa, que se corresponden con

oligómeros formados por 14-24 moléculas de PrP^{Sc} [155]. Este experimento indica que posiblemente los oligómeros son las entidades infecciosas e iniciadoras de las EET y no los grandes agregados amiloides, los cuales podrían constituir un mecanismo de protección frente a los oligómeros de PrP^{Sc} tóxicos ya que los secuestraría en forma de placas amiloides [7]. El papel tóxico de los oligómeros en lugar de los grandes agregados amiloides, que muchos investigadores consideran protectores, también ha sido sugerido en otras enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer [156-158].

Otra de las cuestiones a resolver relacionadas con el mecanismo de conversión priónica es determinar en qué compartimento celular o extracelular tiene lugar. Al tratarse de una proteína anclada a membrana mediante GPI, se cree que el proceso de conversión tiene lugar en las balsas lipídicas, donde la PrP^C y la PrP^{Sc} interaccionarían. No obstante, también se han obtenido evidencias de que la conversión puede tener lugar intracelularmente en vesículas endosomales [66]. La obtención de resultados dispares sugiere que la conversión puede ocurrir en diferentes localizaciones e implicar diferentes rutas [159]. Además, los esfuerzos también se han centrado en determinar si existe una interacción directa o no entre la PrP^C y la PrP^{Sc} y, si es así, en caracterizarla para determinar su importancia en el mecanismo de conversión. En este sentido, el estudio realizado con modelos animales por parte de Meier y colaboradores, donde expresaron una PrP^C soluble dimérica [160], así como aquel realizado por el grupo de Prusiner, donde se expresó la PrP^C de ratón y de hámster en un mismo modelo animal [161], mostraron evidencias de que la conversión de PrP^C a PrP^{Sc} se da a través de la formación de un complejo PrP^C/PrP^{Sc}. Sin embargo, la existencia de este complejo nunca se ha podido demostrar definitivamente y no está claro si en el proceso de conversión pueden participar otros componentes [7]. Del estudio de Prusiner también se determinó que la interacción PrP^C-PrP^{Sc} parece estar favorecida cuando las secuencias aminoacídicas de ambas isoformas son idénticas, lo que explicaría el fenómeno de transmisión interespecífica. A pesar de que la PrP^C se encuentra muy conservada, existen diferencias en la secuencia de aminoácidos de cada especie, lo que se traduce en una dificultad para malplegar una PrP^C con una estructura primaria no idéntica a la PrP^{Sc} que hace de semilla, surgiendo una barrera entre dichas especies para la conversión. Este hecho se confirmó mediante un estudio *in vitro* donde se utilizaron PrP de hámster y de ratón. La PrP^C y PrP^{Sc} de ambas especies podían unirse y coagregar, pero con una tasa de conversión muy baja. Es decir, la diferencia en las secuencias de aminoácidos es más importante en el proceso de malplegamiento que en la formación del complejo inicial, por lo que se sugirió que podrían darse interacciones moleculares durante el evento de conversión [162].

Hoy en día son dos los modelos que se han propuesto para explicar el mecanismo de conversión priónica y que están actualmente en discusión (Figura 4). Ambos se proponen teniendo en cuenta la validez de la hipótesis de “solo proteína” y los limitados datos que conocemos sobre dicho mecanismo.

2.3.1. Modelo de conversión inducida por molde

Este modelo fue propuesto por Prusiner y sugiere la existencia de una interacción directa entre la PrP^C y la PrP^{Sc} donde la isoforma patológica actúa como molde induciendo su mismo tipo de malplegamiento a la isoforma celular [163] (Figura 4 a). En este modelo la transformación directa y espontánea de PrP^C a PrP^{Sc} está termodinámicamente desfavorecida o en parte impedida debido a la existencia de una barrera energética entre ambas isoformas. Debido a la existencia de EET de origen genético y esporádico, este modelo de malplegamiento inducido por molde no explicaría la aparición inicial de una PrP^{Sc} sin la ayuda de fuentes externas. Por tanto, se requiere la adición de un nuevo estado conformacional denominado PrP^{*}, que no es más que un estado transitorio intermedio entre PrP^C y PrP^{Sc}. Así, este modelo explica las diferentes formas de la enfermedad según su etiología. En el caso del origen adquirido el estado intermedio transitorio participaría en la formación de PrP^{Sc} a través de la formación de un heterodímero PrP^{*}-PrP^{Sc} exógeno. Para explicar la enfermedad esporádica el modelo postula la ocurrencia de un evento molecular muy infrecuente como es la formación de un homodímero PrP^{*}-PrP^{*}, que luego evoluciona a homodímero de PrP^{Sc}-PrP^{Sc}. También postula que puede deberse a la aparición espontánea de una mutación somática que conduzca a la formación de PrP^{Sc}, de forma que la enfermedad se desarrollaría como en el caso de una EET genética; finalmente, en el caso de las enfermedades priónicas genéticas las mutaciones asociadas podrían incrementar la inestabilidad de la PrP^C reduciendo la barrera energética y por consiguiente aumentando la concentración de PrP^{*} y/o podrían estabilizar el homodímero PrP^{*}-PrP^{*}, lo que aumentaría la probabilidad de que dicho homodímero se convierta en PrP^{Sc} [72].

2.3.2. Modelo de nucleación-polimerización

Este modelo fue propuesto por Jarret y Lansbury y en él se propone que la PrP^C y PrP^{Sc} coexisten en un equilibrio termodinámico reversible en solución que en condiciones fisiológicas se encuentra desplazado hacia la PrP^C, siendo esta la forma predominante (Figura 4 b). Debido a la inestabilidad de la PrP^{Sc} monomérica esta tiende a formar agregados más estables, desplazando el equilibrio termodinámico hacia la formación de PrP^{Sc} conforme se van sumando al núcleo de agregación unidades de esta y formando agregados de mayor tamaño [164]. Se trata de un modelo en el que el inductor de la conversión de la PrP^C sería un agregado altamente ordenado de moléculas de PrP^{Sc}. El proceso se dividiría en dos fases: una primera fase de latencia en el que se va formando un núcleo o semilla inicial de forma muy lenta. Seguidamente, existiría una segunda fase de crecimiento

exponencial del polímero en el que nuevas PrP^{Sc} monoméricas son reclutadas por el núcleo en expansión, lo que llevaría a la formación de agregados de tipo amiloide y a la estabilización de la semilla. La fragmentación del núcleo a medida que crece de tamaño genera nuevos núcleos que a su vez pueden reclutar más PrP^{Sc}, favoreciendo la propagación del agente que cada vez ocurre de forma más rápida. De ser cierto, la existencia en condiciones fisiológicas de cantidades mínimas y transitorias de PrP^{Sc} monomérica debido al equilibrio termodinámico existente y a su distribución por todo el organismo debido a la ubicuidad de la PrP^C, hacen que la PrP^{Sc} monomérica u oligomérica no pueda ser considerada la entidad infecciosa. El material infeccioso serían los agregados de PrP^{Sc} altamente ordenados y considera que los monómeros de PrP^{Sc} son tóxicos, pero tienen una alta tendencia a incorporarse a los núcleos de polimerización nacientes [7]. Este modelo hipotético explicaría las diferentes formas de la enfermedad de la siguiente forma: en el caso de la etiología adquirida la entrada de agregados de PrP^{Sc} exógenos al organismo actuaría como núcleos o semillas iniciadores de la propagación. En el caso de las EET esporádicas, la formación de los primeros núcleos sería un proceso lento e infrecuente, que se vería acelerado por la presencia de mutaciones que aumentan la tendencia de la PrP^C al malplegamiento en el caso de las EET hereditarias.

A día de hoy ninguno de los modelos anteriores ha podido ser confirmado o descartado experimentalmente, debido a que existen pruebas a favor y en contra de ambos. Con respecto al modelo de conversión inducida por molde, la denominada proteína X, un componente esencial en la reacción que catalizaría la formación del heterodímero PrP^C-PrP^{*}, aún no ha sido identificada y, aunque inicialmente se pensó que era un componente proteico, podría ser parte del agente infeccioso o bien ser un componente celular que facilite la conversión, pero no formar parte del agente [165]. Por tanto, la detección e identificación de este factor sería clave para respaldar este modelo de conversión. No obstante, la generación de priones *in vitro* usando componentes mínimos y altamente purificados (PrP recombinante, RNAm y lípidos) sugiere que el factor X podría no ser un componente proteico específico, sino que podría tratarse de un componente celular abundante que sin ser parte del agente infeccioso podría actuar como cofactor ayudando a catalizar el proceso [166]. Existen otros indicios que apoyan el modelo de conversión inducida por molde, como es la demostración *in vitro* de la existencia de un estado conformacional intermedio entre la PrP^C y la PrP^{Sc}, que correspondería con la PrP^{*} [167]. De igual forma existen evidencias que apoyan al modelo de nucleación-polimerización. Entre ellas destacan los modelos matemáticos [168] y los datos obtenidos a través de ensayos de conversión libre de células, que demuestran que los oligómeros compuestos por menos de seis unidades de PrP^{Sc} no son infecciosos en hámster sirio, por lo que refuta la idea de que los dímeros de PrP^{Sc} que postula el modelo de conversión inducida por molde son los responsables de propagar la enfermedad [155]. Sin embargo, en contra del modelo de nucleación-polimerización están los datos

que parecen confirmar que, en otras enfermedades, como la enfermedad de Alzheimer u otras amiloidosis, los grandes agregados son relativamente inertes y no tan responsables de la propagación de la patología como lo serían los agregados más pequeños. Estos grandes agregados altamente ordenados tendrían un rol protector frente a los oligómeros tóxicos más que inducir o mediar en la neurotoxicidad *per se*. Por tanto, todo parece apuntar a que son los pequeños agregados de PrP^{Sc}, más que los dímeros o grandes agregados de la misma, los responsables de catalizar la conversión de la PrP^C a PrP^{Sc} [165].

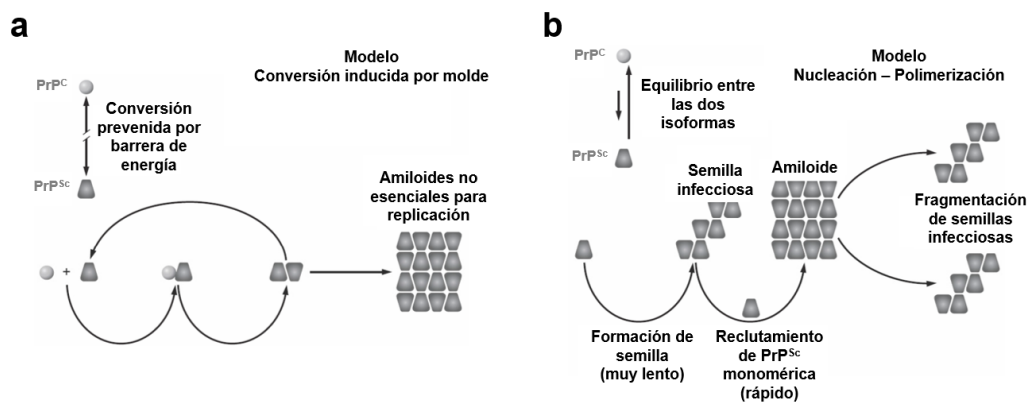


Figura 4. Representación esquemática de los modelos de conversión de priones. a) Modelo de conversión inducida por molde. **b)** Modelo de nucleación-polimerización. (Modificado de [7]).

2.4. PrP^{Sc}

Uno de los mayores obstáculos para el avance en el conocimiento de los mecanismos y fenómenos implicados en las proteinopatías, donde las proteínas implicadas en la patología adoptan una conformación estructural anómala, es la falta de información sobre la estructura atómica de dichas proteínas malplegadas y/o los agregados que forman [169]. Esto es lo que ocurre en las EET, donde en contraposición con la PrP^C, la estructura tridimensional de la PrP^{Sc} aún no ha sido descifrada. Conocer la estructura del agente infeccioso es una condición indispensable para comprender los mecanismos de propagación, la neurotoxicidad y las bases moleculares que definen la barrera de transmisión interespecies y la existencia de diferentes cepas priónicas, así como para diseñar nuevas aproximaciones terapéuticas [170]. Sin embargo, a pesar de los grandes esfuerzos que se han llevado a cabo para lograr este objetivo, han sido varios los obstáculos que han imposibilitado la resolución de su estructura hasta ahora. Uno de los principales es la composición de la PrP^{Sc}, formada por polímeros de diferentes tamaños en equilibrio dinámico, lo que dificulta la resolución estructural de la unidad básica de PrP^{Sc} [155]. La hidrofobicidad de los agregados de PrP^{Sc}, insolubles en agua, también representa un gran impedimento para su estudio ya que, en las condiciones requeridas para la mayoría de las técnicas estructurales, la PrP^{Sc} forma agregados no cristalinos. Estos agregados pueden solubilizarse en detergentes, pero su infectividad se ve comprometida, por lo que los datos que se

obtienen podrían no corresponderse con la estructura infectiva real [171]. Además, la purificación de PrP^{Sc} a partir de muestras encefálicas es compleja como consecuencia de la co-purificación de otras proteínas, lípidos y ácidos nucleicos [172]. Otra de las dificultades importantes a la hora de determinar la estructura de la PrP^{Sc} es el alto peso molecular de los agregados que forma y la heterogeneidad de los mismos, debido a la presencia de formas diglicosiladas, monoglicosiladas y no glicosiladas de PrP^{Sc}. Esto supone un gran obstáculo para la aplicación de técnicas biofísicas tales como la Cristalografía de rayos X o la RMN [173].

No solo las características biofísicas inherentes a la PrP^{Sc} dificultan la resolución estructural de la misma. Existen otros obstáculos igual de importantes que dificultan los estudios estructurales y que están relacionados con la biología de los priones. Uno de los principales es la gran variedad de cepas de priones existentes, así como la gran variedad de agregados de PrP^{Sc} asociados a la enfermedad. Podemos definir las cepas de priones como variantes conformacionales con estructuras autopropagativas subyacentes diferentes. Además, incluso para una misma cepa de priones se han observado diferentes ultraestructuras y características bioquímicas [174]. Cabe preguntarse si las diferentes cepas priónicas existentes presentan un núcleo estructural definido y conservado, o más bien son el reflejo de variaciones en la organización tridimensional de los monómeros de la PrP^{Sc}. Por tanto, esto sugiere que puede no haber una única estructura, y por ello, debemos plantearnos como solventar esta amplia heterogeneidad a la hora de resolver su estructura tridimensional [170]. En este sentido, las técnicas de propagación de priones *in vitro* actuales pueden ayudar a superar estas limitaciones, como se explicará en apartados posteriores.

2.4.1. Heterogeneidad de los agregados de PrP recombinantes obtenidos *in vitro*

La producción y utilización de PrP recombinante (rec-PrP) purificada a partir de *E. coli* constituye una de las herramientas más importantes dentro del campo de los priones. Desde que en 1997 Wüthrich y colaboradores implementaran un nuevo método para obtener rec-PrP pura y en grandes cantidades a partir de *E. coli* [175] su uso ha sido extendido a casi todas las áreas de investigación de las EET. Los ejemplos más claros son su uso para la elucidación estructural de las isoformas celular y patogénica, para mejoras en diagnóstico y para búsqueda de compuestos anti-priónicos, entre otros [176]. Sin embargo, a pesar de que se han conseguido obtener priones recombinantes *in vitro* con características bioquímicas similares a los priones de mamíferos, estos presentan propiedades biológicas dispares cuando se inoculan en animales. Algunos de ellos han resultado ser biológicamente inertes y otros altamente infecciosos [177]. Las evidencias de las que disponemos sugieren que esta heterogeneidad es un reflejo de la amplia heterogeneidad estructural que pueden adoptar los amiloides en general, así como un reflejo de la existencia de diferencias conformacionales de las cepas

priónicas de origen natural. Además, los diferentes sistemas *in vitro* utilizados para su generación también serían responsables de la variabilidad y amplio espectro conformacional a nivel de estructura terciaria y cuaternaria que pueden adoptar los priones, y en general los agregados amiloides [101]. Así, algunos sistemas usan agentes desnaturalizantes y agentes caotrópicos como la urea o el hidrocloreuro de guanidinio, diferentes temperaturas, modificaciones en el pH, agitación o sonicación, entre otras variables [178, 179].

Las proteínas amiloidogénicas con una misma secuencia polipeptídica pueden agregarse adoptando diferentes estructuras amiloides, lo que se conoce como polimorfos. Cada polimorfo puede propagarse mediante un proceso dependiente de nucleación o siembra, transmitiendo su conformación a otras proteínas. Estos polimorfos amiloides podrían constituir la base molecular de la existencia de cepas de priones [180]. Además, es importante resaltar que muchas de esas proteínas que agregan formando amiloides pueden no estar relacionadas con enfermedades neurodegenerativas, e incluso pueden no estar asociadas a ninguna patología y constituir lo que se denominan amiloides funcionales [110]. Por tanto, hay que diferenciar entre amiloides y patología, y enfermedad priónica. Es decir, un prion *bona fide* siempre presenta características amiloidogénicas, pero no cualquier tipo de amiloide constituye un prion. Determinadas PrP^{res} (denominadas así por presentar ciertas propiedades bioquímicas características de los priones como la resistencia a proteasas, pero desconocerse aún si es infecciosa) generadas *in vitro* comparten ciertas características con los priones *bona fide*, como su capacidad amiloidogénica y autopropagativa o su resistencia a proteasas, pero no comparten otras, como por ejemplo sus capacidades infectivas o neurotóxicas. Por todo ello, durante esta tesis doctoral denominaremos prion *bona fide* a aquellos priones (recombinantes u obtenidos a partir de encéfalos) que presentan todas las propiedades fundamentales de un prion; y PrP^{res} o agregados/amiloides de PrP, a aquellas entidades obtenidas *in vitro* que no necesariamente presentan todas las características de los priones *bona fide*, pudiendo ser por ejemplo resistentes a la digestión por proteasas pero que no presentan capacidad autopropagativa o no son infecciosos *in vivo*.

2.4.2. Modelos estructurales de las fibras de PrP^{Sc}

Desde hace décadas, a pesar de las limitaciones descritas previamente, se han propuesto varios modelos para la estructura de la PrP^{Sc}. Muchos de ellos se han descartado por no ser compatibles con las evidencias que se han ido obteniendo con el avance de las investigaciones. Por el contrario, otros han sido refinados gracias a los datos obtenidos por medio de diferentes técnicas, al principio de baja resolución, como el dicroísmo circular (CD, del inglés *Circular Dichroism*) o la FTIR, y posteriormente cada vez con más capacidad resolutoria, como las técnicas de microscopía electrónica, resonancia

magnética o las de difracción de rayos X [173]. Las técnicas de espectroscopía clásica (CD y FTIR) muestran que la PrP^{Sc} presenta una estructura formada principalmente por hoja-β mientras que la PrP^C es mayoritariamente α-helicoidal [68, 181]. Sin embargo, las primeras interpretaciones de los datos obtenidos por FTIR hacían pensar que la PrP^{Sc} conservaba ciertas regiones de hélice-α. No obstante, estudios posteriores han demostrado que se trataba de una interpretación errónea de los datos y que la PrP^{Sc} está completamente desprovista de estructura α-helicoidal, presentando aproximadamente un 50% de su estructura secundaria en hoja-β y el resto formando giros o lazos [182]. La ausencia de hélice-α en la estructura de la PrP^{Sc} también ha sido recientemente demostrada por técnicas con mayor resolución estructural como la RMN de estado sólido [183]. La aplicación de estas técnicas de espectroscopía clásica a diferentes cepas de priones ha servido también para demostrar la existencia de diferencias en la estructura secundaria de la PrP^{Sc} asociada específicamente a cepas de priones [184, 185]. Por otro lado, los análisis de FTIR de PrP^{Sc} no glicosilada obtenidos gracias a los modelos murinos que expresan la PrP^C sin GPI, indican que la presencia de GPI y glicanos no afectan a la estructura general de la PrP^{Sc}, ya que no hay diferencias entre la PrP^{Sc} con GPI y glicosilada de animales WT y la PrP^{Sc} sin GPI y sin glicosilar [186].

La proteólisis limitada también ha aportado datos estructurales de las fibras de PrP^{Sc}, dado que desde su descripción se conoce que esta es parcialmente resistente a la digestión por PK [56]. Esta digestión genera un fragmento truncado de la PrP^{Sc} de unos 27-30 kDa (PrP²⁷⁻³⁰) como consecuencia de la digestión de aproximadamente 90 aminoácidos del extremo N-terminal (aproximadamente 12 kDa). El mantenimiento de la capacidad infectiva de esta forma truncada indica que los primeros 90 aminoácidos de la PrP^{Sc} no son imprescindibles para la conversión y propagación de la misma [187]. Además, la proteólisis limitada también ha sido utilizada para diferenciar y caracterizar diferentes cepas, debido a que cada una de ellas puede mostrar una resistencia diferencial a la proteólisis con zonas de corte específicas. Esto sugiere que el plegamiento y ultraestructura de cada cepa varía ligeramente [188]. Otra de las técnicas que ha ayudado a una mayor comprensión de la estructura es el mapeo de epítomos mediante anticuerpos monoclonales, la cual ha revelado información sobre la accesibilidad de las distintas regiones dentro de la fibra de PrP^{Sc}. Así, estos estudios han identificado una zona no accesible a anticuerpos que comprende más o menos desde la posición 90 hasta la 120. Por el contrario, ha mostrado una mayor accesibilidad en la región C-terminal correspondientes a los residuos 152 a 163 y 225 a 231 [189]. Las técnicas microscópicas también han sido ampliamente utilizadas para el estudio de la ultraestructura de los priones. El uso de microscopía electrónica de transmisión (TEM, del inglés *Transmission Electronic Microscopy*) junto con técnicas de tinción negativa es un método rápido para evaluar la morfología del agregado y para medir el tamaño del mismo en dos dimensiones (2D) [57, 190], pero con la limitación de una resolución baja. La microscopía de fuerza

atómica (AFM, del inglés *Atomic Force Microscopy*) [191] y el reciente desarrollo de la criomicroscopía electrónica (cryoEM, del inglés, *cryogenic Electron Microscopy*) [192] están permitiendo obtener una información más detallada de la estructura de la PrP^{Sc}. Estas técnicas se aprovechan de la estructura repetitiva y ordenada que presentan los agregados para extraer información molecular más compleja, como las dimensiones de las fibras. De especial importancia es el modelo estructural elaborado a partir de los datos de cryoEM por parte de Vázquez-Fernández y colaboradores, el cual describiremos más adelante en esta sección.

Las técnicas de difracción de rayos X también han aportado conocimiento estructural en el campo de los priones, tales como la dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS, del inglés *Small Angle X ray Scattering*), la difracción de rayos X o la cristalografía de rayos X [193]. A pesar de que no se han podido obtener cristales de PrP^{Sc} adecuados a partir de encéfalos para su estudio por cristalografía, sí que se han podido obtener patrones de difracción de baja resolución [194]. Estos datos han permitido estudiar el empaquetamiento de los núcleos resistentes a proteasas y la organización general de los agregados de PrP^{Sc}. El uso de la técnica de difracción de rayos X con agregados de PrP^{Sc} ha permitido identificar en ellos un motivo estructural denominado cross- β -sheet, el cual es característico de las fibras amiloides. Este motivo estructural consiste en un apilamiento perpendicular al eje longitudinal de la fibra de las hojas- β . Los datos obtenidos para la PrP^{Sc} indican que presentan estos motivos cross- β , pero con importantes diferencias [195]. Por último, es necesario destacar también la contribución de las técnicas de RMN a la elucidación de la estructura de la PrP^{Sc}, y en particular de la RMN de estado sólido. Estudios *in vitro* llevados a cabo con la proteína Y145Stop (mutación asociada al GSS) dio lugar a una cepa infecciosa *in vivo* que mediante RMN de estado sólido reveló disponer de un núcleo formado por hoja- β que se extiende desde la posición 112 hasta la 139 o 141, según la especie [196]. Esta misma técnica también se ha aplicado a PrP^{Sc} de tamaño completo, en concreto a fibras amiloides infecciosas formadas de PrP recombinante de oveja. Este estudio presenta unos datos más cercanos a la realidad por tratarse de la PrP completa y en él se observó un núcleo formado totalmente por hoja- β en el extremo C-terminal de aproximadamente 155 aminoácidos [197]. Existen otras modalidades de RMN como la RMN de estado sólido paramagnética o la técnica de intercambio hidrógeno-deuterio acoplada a RMN, las cuales también han permitido obtener datos sobre las áreas o residuos más empaquetados o expuestos de las fibras amiloides de PrP^{Sc} [198, 199].

La gran cantidad de datos obtenidos gracias a las técnicas estructurales de baja resolución ha permitido la generación de un número considerable de modelos teóricos estructurales de la PrP^{Sc}. Sin embargo, muchos de estos modelos no satisfacen las observaciones experimentales actuales y han sido prácticamente descartados. Este es el caso del modelo de hélice- β [200], ya que los datos de difracción de rayos X descartan la altura de las moléculas propuesta por este modelo [195]. También

es el caso del modelo de espiral- β , que no satisface las evidencias obtenidas en los experimentos de proteólisis limitada e intercambio hidrógeno-deuterio [201]. Por tanto, vamos a describir los dos principales modelos estructurales propuestos hoy en día (Figura 5), los cuales han sido generados acorde a las evidencias que se disponen.

Modelo de hoja- β paralela en registro

Este modelo denominado de hoja- β paralela en registro (PIRIBS, del inglés *Paralell In-Register Intermolecular β -Sheet*) fue propuesto en primer lugar por Cobb y colaboradores y fue desarrollado utilizando PrP recombinante humana a través de experimentos de intercambio de hidrógeno-deuterio acoplado a espectrometría de masas y de resonancia paramagnética electrónica (EPR, del inglés *Electronic Paramagnetic Resonance*). En este estudio se propone una estructura formada por hojas- β paralelas que se disponen en registro, lo que permite un crecimiento infinito de la fibra. Cada molécula de PrP tendría una altura de 4.8 Å y estaría formada únicamente por hojas- β plegadas sobre sí mismas [202] (Figura 5 a). Otros estudios elaborados mediante RMN de estado sólido o estudios *in silico* de dinámica molecular han mostrado también evidencias a favor de este modelo. Dichos estudios se han elaborado utilizando amiloides de PrP formados mediante nucleación espontánea o mediante la adición de PrP recombinante como semilla, lo que reforzaría la idea de que amiloides de PrP con diferente origen pueden adoptar esta conformación PIRIBS [183, 203]. También se han mostrado datos a favor de este modelo utilizando PrP²⁷⁻³⁰ purificada a partir de encéfalos de ratones sin GPI; un modelo animal que expresaba una PrP con muy poca glicosilación y sin el anclaje al GPI, lo que evitaba las posibles interferencias debido a la existencia de cambios post-traduccionales en la proteína. Además, dichos resultados indican que este modelo PIRIBS podría ser el más parecido a algunos de los priones presentes en el encéfalo de personas afectadas [199]. Otro dato a favor de este modelo se ha basado en el uso de RMN de estado sólido aplicado a una PrP recombinante Y145Stop (una mutación asociada a GSS) malplegada que había mostrado infectividad previamente [198, 204]. A diferencia de otros modelos propuestos, la PrP^{Sc} de este modelo está formada únicamente por hojas- β y giros y/o lazos relativamente cortos entre ellas, sin hélices- α presentes, lo que indica que la conversión a PrP^{Sc} implica adoptar un nuevo plegamiento sin conservar ninguno de los motivos estructurales de la PrP^C [183]. Por el contrario, una de las principales críticas a este modelo es su incompatibilidad con las mediciones de altura obtenidas de forma independiente mediante difracción de rayos X [195] y cryoEM [192], las cuales indican que la altura de una molécula de PrP^{Sc} es de 19.2 Å. Además, otra crítica importante es su incapacidad para acomodar las glicosilaciones presentes en la PrP^{Sc} de forma natural. El alto grado de empaquetamiento que requiere el modelo provoca que el espacio disponible para los glicanos sea mucho menor que el tamaño de estos [170, 182]. Por

tanto, aunque los indicios apuntan a que diversos agregados amiloides podrían adoptar esta configuración PIRIBS, aún se debe confirmar si los priones más comunes presentes en la Naturaleza adoptan la conformación propuesta por el modelo PIRIBS.

Modelo de hojas- β en solenoide de cuatro pisos

Este modelo, denominado de hojas- β en solenoide de cuatro pisos (4R β S, del inglés *4-Rung β -Solenoide*), propone que la PrP^{Sc} está formada por hojas- β enrolladas sobre sí mismas formando un solenoide de cuatro pisos (Figura 5 b) y ha sido desarrollado recientemente a partir de los datos obtenidos por cryoEM y reconstrucciones tridimensionales (3D) usando PrP^{Sc} sin GPI. Cada monómero de PrP^{Sc} formaría cuatro niveles o pisos en el solenoide, siendo la altura de cada piso de 4.8 Å, ya que es la altura de una hoja- β individual según los datos de difracción de rayos X. Los análisis de reconstrucción 3D de fibrillas amiloides de PrP^{Sc} individuales determinaron que la altura molecular de cada monómero de PrP^{Sc} a lo largo del eje de la fibrilla variaba entre 16.1 Å y 19.25 Å. La altura teórica esperada para un β -solenoide formado por cuatro niveles es de 19.2 Å (4 x 4.8 Å). El análisis de un número mucho mayor de fibrillas o protofilamentos individuales arrojó un valor promedio de la altura de las fibras de alrededor de 20 Å y 40 Å. El primer valor estaría en consonancia con la altura esperada para cada fibra individual, mientras que el segundo valor de 40 Å sugiere un ensamblaje mayor de los monómeros a lo largo del eje del protofilamento, que puede corresponderse con la unión de dos monómeros de PrP^{Sc} dentro de la fibra en configuración cabeza-cabeza, cola-cola y/o cabeza-cola. Esta estructura repetida formaría a su vez una fibra mayor al relacionarse con otro protofilamento, dando lugar a una hélice [192]. Los experimentos de difracción de rayos X realizados con muestras de fibrillas amiloides de PrP²⁷⁻³⁰ purificadas de cerebros arrojaron valores de difracción correspondientes a 9.6, 6.4 y 4.8 Å, lo que se corresponde con múltiplos de dos, tres y cuatro, respectivamente, de la altura de 19.2 Å del β -solenoide [195]. Otro dato importante a favor de este modelo, es la ausencia de la señal de 10 Å en esos mismos experimentos, lo que apoya la existencia de un 4R β S en lugar de una estructura de hoja- β paralela en registro (PIRIBS). La ausencia de dicha señal de 10 Å también se ha obtenido para un amiloide de tipo priónico de levadura, el amiloide HET-S, cuya estructura ha sido resuelta mediante RMN de estado sólido, presentando una estructura de β -solenoide de dos pisos [182]. Sin embargo, los datos de difracción obtenidos para priones de origen recombinante sí confirmaron la presencia de la señal características de 10 Å relacionada con el modelo PIRIBS [195]. Esto puede ser debido a las diferencias biológicas y bioquímicas existentes entre los priones purificados de encéfalo y algunos PrP^{res} generadas *in vitro*, por lo cabría esperar que presentasen diferentes estructuras. Los datos de proteólisis limitada utilizando PrP^{Sc} purificada de encéfalo y priones recombinantes generados *in vitro* e infectivos *in vivo* respaldan también este modelo [187, 205]. Además, el alto

grado de compactación del núcleo del β -solenoides propuesto, que estaría formado por las hojas- β localizadas en la región C-globular, con la región N-terminal flexible proyectada hacia el exterior en forma de antena, es compatible con la gran mayoría de evidencias experimentales actuales. Por ejemplo, es compatible con la elevada resistencia que presenta la PrP^{Sc} a la digestión por proteasas, ya que el alto grado de empaquetamiento del núcleo evitaría la proteólisis de la mayor parte de las fibrillas de PrP^{Sc}. También se sabe que tras la digestión con PK se eliminan los primeros 90 (aproximadamente) residuos del extremo N-terminal, lo que también se explica por la disposición que adopta dicha región en este modelo. Cabe destacar que el alto grado de compactación que propone este modelo permite acomodar sin prácticamente ningún impedimento estérico las glicosilaciones características de la PrP^{Sc}, orientadas hacia el exterior de la fibra [182]. Por último, la reciente publicación de un modelo de resolución atómica de la PrP^{Sc} de ratón basado en la arquitectura 4R β S mediante la combinación de datos experimentales y técnicas computacionales ha supuesto otro gran apoyo a favor de este modelo. Este estudio mediante simulaciones de dinámica molecular (MD, del inglés *Molecular Dynamics*) ha confirmado que la estabilidad del modelo 4R β S es similar a la del prion de levaduras HET-s. Además, también permite mediante simulaciones computacionales estudiar el mecanismo de propagación subyacente de los priones basados en el modelo de β -solenoides [206].

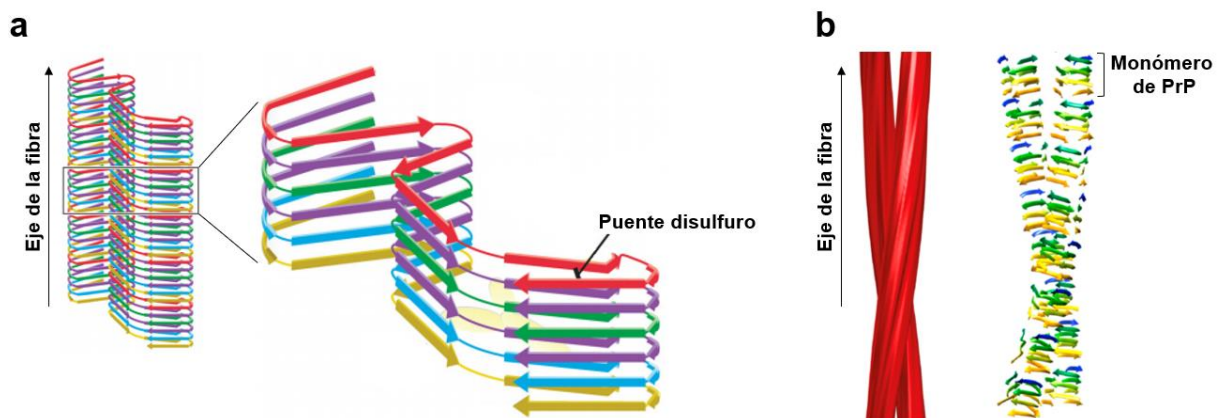


Figura 5. Representación de los dos principales modelos estructurales de las fibras de PrP^{Sc}. a) Modelo de hoja- β paralela en registro. (Modificado de [244]). b) Modelo de hojas- β en solenoide de cuatro pisos. (Modificado de [182]).

2.4.3. Mecanismos de neurotoxicidad

Dada la presencia de placas de PrP^{Sc} que se acumulan en el cerebro y su capacidad de transmitir la enfermedad, se asumió desde un principio que estos grandes agregados eran también los responsables de la neurotoxicidad. Sin embargo, hoy en día existen evidencias que sugieren una disociación entre el fenómeno de formación de agregados proteicos y la neurotoxicidad, no estando del todo claro el papel de la PrP^{Sc} en la muerte neuronal [207]. El desarrollo de los primeros modelos de ratones que no expresaban la PrP^C descartó que su ausencia o pérdida de función por su conversión a PrP^{Sc} fuese la

responsable de la neurotoxicidad, ya que los ratones mostraban un desarrollo normal. Además, demostraron que en ausencia de PrP^C, la PrP^{Sc} no ejerce ningún efecto tóxico en el cerebro de los ratones sin PrP^C, además de ser resistentes a la infección por priones [208, 209]. De igual forma, la eliminación condicional de la expresión de PrP^C en ratones que habían sido previamente infectados con PrP^{Sc} revertió la degeneración espongiiforme en sus etapas iniciales, mostrando los ratones signos de recuperación. Sorprendentemente, la acumulación de PrP^{Sc} en estos animales era similar a los acúmulos presentes en las fases tardías de la enfermedad que sufrían los animales WT [210]. La misma conclusión se obtuvo mediante el injerto de tejido que expresa la PrP^C en ratones *PRNP*^{-/-}, donde solo las neuronas del injerto con PrP^C desarrollaron procesos neurotóxicos cuando se inoculaba PrP^{Sc} en el encéfalo [146]. Por tanto, todos estos experimentos demuestran que la neurotoxicidad no está causada directamente por la presencia de PrP^{Sc}, sino que parece estar mediada por la PrP^C, la cual no es solo necesaria para la propagación. Los estudios con modelos animales que expresan la PrP^C sin GPI, donde existe acumulación de PrP^{Sc}, pero padecen una neurodegeneración notablemente más leve, además de apoyar la idea de que la PrP^C es un mediador clave de la neurotoxicidad hace hincapié en que es necesario que esta se localice anclada a la membrana. Esto otorga también un papel importante al anclaje GPI como transductor de señales al estar integrado en la membrana plasmática [141]. Además, también se han descrito casos de EET, tanto en animales como en humanos, en los que los agregados de PrP^{Sc} en el encéfalo eran mínimos a pesar de mostrar la neurodegeneración característica de estas enfermedades. Todo apunta, por tanto, a una disociación entre la PrP^{Sc} y la neurotoxicidad, la cual podría estar mediada por especies intermedias estables que se forman durante el desarrollo de la enfermedad [83, 211].

La probable disociación entre los agregados de PrP^{Sc} y los mecanismos de neurotoxicidad hace necesario preguntarse cuál es la entidad o especie molecular responsable de dichos mecanismos. El descubrimiento de formas oligoméricas intermedias formadas durante la conversión de PrP^C a PrP^{Sc} [212], teniendo algunas de ellas propiedades neurotóxicas [213], y la demostración de que las especies oligoméricas son las de mayor infectividad [155], ha hecho que se desvíe la atención hacia los oligómeros prefibrilares de PrP^{Sc}. Se ha demostrado que especies oligoméricas solubles, que son parcialmente resistentes a la digestión por PK, son tóxicas *in vitro* e *in vivo*, a diferencia de las formas fibrilares de la PrP^{Sc}, las cuales no muestran neurotoxicidad en cultivos celulares o son menos tóxicas que los oligómeros [214]. Estos resultados pusieron de manifiesto que posiblemente la neurodegeneración en las EET comparte mecanismos con otras amiloidosis, como la EA o la EP. Sin embargo, al igual que en la EA o la EP, la señalización o rutas metabólicas que disparan los procesos de neurotoxicidad en las células siguen sin esclarecerse. Lo que sí parece claro es el papel general de las especies oligoméricas de las proteínas implicadas en las diferentes proteinopatías, como por

ejemplo los oligómeros del péptido A β en la EA o las especies oligoméricas de α -sinucleína en la EP, entre otras. Este hecho ha abierto una nueva ventana en la investigación de la neurotoxicidad asociada a las EET, ya que las rutas de toxicidad de esas otras enfermedades podrían ser comunes a todas ellas [215]. También se ha demostrado la relación entre la PrP^C y los oligómeros anteriormente mencionados relacionados con la EP y la EA, sugiriéndose que la PrP^C podría actuar como receptor e iniciar la cascada de muerte celular responsable de la neurotoxicidad asociada [148, 216]. Por último, en relación con las especies oligoméricas, recientemente se ha demostrado que dichas entidades son las que presentan mayor capacidad de neuroinvasión, es decir, de ser transportadas no solo desde órganos extraneurales hasta el SNC, sino también para el transporte entre neuronas. Los autores de este estudio sugieren que promover o estabilizar las fibras amiloides de PrP^{Sc} podría dificultar la diseminación entre neuronas y ralentizar el progreso de la enfermedad [217], presuponiéndoles un papel protector a los grandes ensamblajes fibrilares a diferencia de los oligómeros, los cuales se considerarían los principales responsables de la neurotoxicidad.

2.4.4. Rutas de entrada y diseminación por el organismo

En el caso de las EET adquiridas, a pesar de que las rutas de entrada de los priones desde el medio exterior hasta el interior del organismo, así como los mecanismos que utilizan para alcanzar y colonizar el SNC son de vital importancia, aún no han sido esclarecidos por completo. Salvo excepciones, donde el agente causal ha sido administrado directamente en el SNC como en el caso de los animales de experimentación, o como durante un trasplante de duramadre contaminada con priones, la adquisición de los mismos por parte del individuo suele implicar otras rutas de entrada [7]. La ruta de entrada natural más frecuente es la vía oral, como en el caso del kuru [218], de la BSE [219], de la vCJD [220] o la CWD en cérvidos [221]. No obstante, existen otras rutas como por ejemplo la inyección intravenosa y peritoneal [222], la inyección intraocular [223] o los trasplantes de córnea [41]. En todas estas circunstancias, a excepción de la administración directa en el SNC, los priones deben replicarse en los órganos y tejidos periféricos donde se encuentran. La exposición por vía oral es la más frecuente y por tanto una de la más estudiadas a nivel experimental. Los estudios realizados sobre esta ruta de adquisición revelaron hace décadas que algunas de las células del sistema inmunitario del hospedador juegan un papel importante en la captación y diseminación de los priones [224]. Tras la ingestión de PrP^{Sc}, se ha determinado que es en las placas de Peyer, un cúmulo de tejido linfático del intestino delgado, donde se acumulan inicialmente los priones. La inoculación intragástrica de PrP^{Sc} en ratones resultó en el desarrollo de la enfermedad, observándose dicha acumulación [222]. Además, se ha demostrado que existe una correlación positiva entre la susceptibilidad a la infección por priones y el número de placas de Peyer en el intestino delgado [225]. Estas observaciones demostraron la

implicación de las placas de Peyer en la entrada de los priones por vía oral. Concretamente, las evidencias indican que son las células M, localizadas en la superficie de este tejido linfoide, las responsables de la captación de la PrP^{Sc}. La función fisiológica de estas células es la de inmunovigilancia y son usadas por los priones y otros patógenos para invadir la mucosa intestinal. Estudios *in vivo* han demostrado que las células M son las responsables de captar la PrP^{Sc} administrada por vía oral y que la enfermedad inducida por ruta oral puede ser inhibida mediante la ablación de las células M a través de la administración de diferentes compuestos [226]. Otros mecanismos de entrada independientes de células M han sido identificados, como la transcitosis de la PrP^{Sc} a través de los enterocitos [227], en la que podrían participar mecanismos dependientes de ferritina [228] o mecanismos de endocitosis mediados por la unión al receptor de laminina [229]. Aun así, los mecanismos usados por la PrP^{Sc} para ser captada por las células del epitelio intestinal no están del todo claros. En este sentido, un reciente estudio ha demostrado que la neuroinvasión de los priones administrados por vía oral ocurre de forma independiente a la expresión de PrP^C en el epitelio gástrico [230], descartando que en dichos mecanismos participe la PrP^C. Además, en este y otros estudios ha quedado demostrado que una inflamación sostenida de la pared intestinal puede provocar el aumento de la captación de PrP^{Sc}, constituyendo un factor de riesgo. De igual modo, la colitis bacteriana aumenta la susceptibilidad a la infección por priones por vía oral [231].

Una vez que la PrP^{Sc} ha sido captada por las placas de Peyer comienza la fase de replicación periférica y propagación por el organismo, en la que están implicadas las células dendríticas foliculares. Para poder alcanzar su destino final, es decir el SNC, es necesario que primero alcancen los nervios entéricos, en el caso de la exposición oral, o en el caso de otros tejidos linfáticos inervados, los nervios del sistema simpático [224]. Diversas formas de simpatectomía han demostrado que previenen o retrasa de forma significativa la patogénesis priónica periférica. Por el contrario, una hiperinervación simpática provoca un acortamiento de los tiempos de incubación en ratones, mostrando que la inervación simpática de los tejidos linfoides secundarios, es un factor limitante para la neuroinvasión priónica [232]. Del mismo modo, otros resultados han mostrado que la reducción de la distancia entre las células dendríticas foliculares de estos órganos y sus terminaciones nerviosas provoca un aumento de la neuroinvasión [233]. La forma en la que la PrP^{Sc} es capaz de pasar desde las células dendríticas foliculares hacia las terminaciones nerviosas tampoco está resuelta del todo. Existen evidencias que permiten proponer tres hipótesis, las cuales no son excluyentes entre sí: i) contacto célula-célula; ii) transporte vesicular o iii) flotando libremente en el medio extracelular [7]. Independientemente del mecanismo que utilicen los priones para entrar en las terminaciones nerviosas, la manera de cómo son transportados a través de los nervios hasta alcanzar las neuronas aún no ha sido resuelta. Una de las suposiciones que podemos formular basándonos en la hipótesis de “solo proteína” es que la PrP^{Sc} se

transporta de forma secuencial a través de los nervios, ya que iría malplegando sucesivamente las moléculas de PrP^C de la superficie de las células nerviosas que se encuentran en su camino hasta alcanzar las neuronas. Se trata de un modelo que encajaría bien con la extremada lentitud de la propagación neuronal [234]. Otras hipótesis no descartan que existan mecanismos de transporte tanto axonal como no axonal, e incluso, que en dicho transporte participen de forma activa otras células no neuronales del sistema nervioso como las células de Schwann [7]. En este sentido, uno de los posibles escenarios es que los priones sean transportados al igual que otras proteínas por los axones de los nervios periféricos. En este caso, se llevaría a cabo un transporte de tipo retrogrado posiblemente mediado por mecanismos asociados a microtúbulos. Los estudios donde se inoculan intraocularmente los priones [223], así como la transmisión iatrogénica de la CJD tras la realización de trasplantes de corneas son los principales respaldos a esta última hipótesis [235]. Las dificultades implícitas para estudiar los mecanismos de transporte desde zonas periféricas hasta el SNC, junto con la posibilidad de que diferentes cepas de priones hagan uso de mecanismos de transporte específicos [236], ha contribuido enormemente a que los mecanismos de diseminación sigan aún sin esclarecerse.

Para otras rutas de adquisición, como la inyección intralingual, parece que la neuroinvasión se logra directamente a través de los nervios craneales [237], mientras que en otras rutas de entrada, como la inyección intravenosa o intraperitoneal, se ha demostrado una implicación directa del sistema linforeticular al igual que en la exposición oral. La implicación del bazo [238] y de los nódulos linfáticos [239] como tejidos infecciosos en la replicación periférica de priones se conoce desde hace años. En ambos se ha demostrado que existe acumulación de PrP^{Sc}. A partir de la publicación de estos estudios se ha identificado una gran cantidad de células del sistema inmunitario que participan en la patogénesis periférica de las enfermedades priónicas [224]. La relevancia de los linfocitos en los procesos de diseminación priónica se demostró tras observar que estos expresaban niveles moderados de PrP^C [240]. Además, poco después se indicó que la ausencia de linfocitos circulantes evitaba la adquisición periférica de PrP^{Sc}, mientras que su ausencia no tenía ningún efecto cuando se administraba PrP^{Sc} directamente al SNC [241]. En el mismo estudio también se demostró que la PrP^{Sc} se acumula en las células dendríticas de los nódulos linfáticos. Más tarde quedaría demostrado que no es necesaria la expresión de PrP^C en los linfocitos circulantes para el desarrollo periférico de la enfermedad, sugiriendo que estos linfocitos actúan meramente como transportadores de PrP^{Sc} a los nódulos linfáticos. Las células dendríticas foliculares estarían implicadas en la replicación y propagación de la PrP^{Sc} [242]. Sin embargo, otros estudios con diferentes cepas priónicas mostraron que los linfocitos eran irrelevantes para la progresión de la patología periférica, lo que parece indicar que los requerimientos celulares de las distintas cepas son diferentes según la cepa considerada [243].

A pesar de haberse demostrado una clara participación del sistema inmunitario en la adquisición y diseminación priónica, los mecanismos usados por la PrP^{Sc} para evadir su vigilancia siguen sin estar resueltos. Una infección exitosa requiere de una evasión inmunitaria exitosa y se piensa que esto lo consigue la PrP^{Sc} debido a que la respuesta inmunitaria está restringida al tratarse de una proteína que se expresa de forma endógena, aunque no esté malplegada. En este sentido, el alto nivel de empaquetamiento que parecen presentar los oligómeros de PrP^{Sc}, junto con sus glicosilaciones, pueden provocar que los epítomos conformacionales que la distinguen de la PrP^C sean de difícil acceso para las células inmunitarias [244]. Sin embargo, cuando los oligómeros o agregados de PrP^{Sc} alcanzan el SNC se produce una gliosis reactiva consistente en la activación de astrocitos y microglía, las principales células inmunitarias del SNC. El papel de la microglía en las enfermedades priónicas ha sido durante mucho tiempo un foco importante de discusión, ya que estudios contradictorios indicaban roles muy diferentes para este tipo celular. Sin embargo, hoy en día todo parece apuntar que la microglía desempeña un rol neuroprotector en las EET [245]. Por ejemplo, la inactivación farmacológica de la microglía durante la infección priónica se traduce en una aceleración de la enfermedad debido a un aumento en el acúmulo de PrP^{Sc} en el encéfalo de los animales infectados [246]. Esto sugiere la posibilidad de desarrollar estrategias terapéuticas enfocadas a potenciar el rol neuroprotector de la microglía.

3. Fenómenos de cepas y barrera de transmisión

3.1. Fenómeno de cepa

Las cepas priónicas se definirían como aislados infecciosos que, cuando se transmiten a hospedadores singénicos en condiciones fijas y controladas, estos exhiben fenotipos distintos de la enfermedad [247]. Este hecho ha puesto en jaque durante mucho tiempo a los defensores de la hipótesis de “solo proteína”, ya que cuestionaba el dogma central de la biología, según el cual solo los ácidos nucleicos podían codificar la información necesaria para originar diferentes cepas de un mismo agente infeccioso. Sin embargo, hay evidencias experimentales que explicarían el fenómeno de cepa a través de la existencia de diferentes variantes conformacionales de la PrP^{Sc} que comparten una misma secuencia aminoacídica [184, 185, 248]. Por tanto, las características fenotípicas y bioquímicas específicas de cada cepa estarían codificadas en las diferencias estructurales y conformacionales de la PrP^{Sc} que conforma la cepa [174]. Las diferentes cepas de priones pueden ser clasificadas utilizando las características que presentan *in vivo*, así como a través de sus propiedades bioquímicas. Las distintas cepas, además de diferenciarse por los signos clínicos que inducen en el individuo al que infectan, también muestran otras características diferenciales como el periodo de incubación, el perfil de

lesiones histopatológico y el patrón específico de depósitos de proteína agregada en el SNC [249]. Por otro lado, las propiedades bioquímicas más relevantes de las diferentes cepas son la resistencia a la digestión por PK, la movilidad electroforética tras la digestión con PK, la velocidad de sedimentación, el patrón de glicosilación de la PrP^{Sc} y la resistencia a la desnaturalización por agentes caotrópicos. El fenotipo que presenta una determinada cepa *in vivo* y sus propiedades bioquímicas normalmente persisten durante su transmisión mediante pases seriados en el mismo hospedador [250].

Las primeras evidencias de la existencia de cepas de priones las obtuvieron Pattison y colaboradores en la década de los 60, gracias a sus estudios de transmisión del scrapie de ovejas a cabras. En estos estudios describieron que las cabras infectadas con el mismo material infeccioso procedente de encéfalos de ovejas con scrapie mostraban dos síndromes clínicos bien diferenciados, a los cuales llamaron “*scratching*” y “*nervous*”, de acuerdo a los signos clínicos que manifestaban los animales [77]. Sin embargo, uno de los estudios cruciales para relacionar la existencia de cepas priónicas con variaciones en la estructura terciaria y cuaternaria de la PrP^{Sc} lo llevaron a cabo Bessen y colaboradores a principio de los noventa. Estos investigadores utilizaron dos cepas claramente distinguibles de hámster, conocidas como *Hyper* (HY) y *Drowsy* (DY). Además de observarse dos manifestaciones fenotípicas completamente diferentes de la enfermedad en los hámsteres infectados con ambas cepas, la purificación de los priones a partir del encéfalo de los hámsteres infectados indicó claras diferencias en las propiedades fisicoquímicas de la PrP^{Sc} causante de una u otra sintomatología. Estas diferencias estaban principalmente relacionadas con la velocidad de sedimentación de ambas cepas y la diferente resistencia al tratamiento con agentes desnaturalizantes [251]. Experimentos posteriores con las mismas cepas revelaron la existencia de dos núcleos resistentes a PK de diferente tamaño según la movilidad electroforética de ambos [252]. La explicación aportada por los autores, al no hallarse ninguna otra diferencia y al tratarse de cepas con la misma secuencia aminoacídica, fue que estas diferencias eran consecuencia de variaciones estructurales entre ambas cepas. Una de las cepas presenta una estructura donde hay un mayor número de aminoácidos expuestos a la digestión con PK, mientras que la estructura que adopta la otra cepa dispone los aminoácidos en una situación menos accesible a la PK. No obstante, debido a que aún no ha sido posible determinar la estructura tridimensional de la PrP^{Sc} ni de sus fibras, no se ha podido corroborar con total seguridad todas estas evidencias que relacionan los cambios estructurales con la generación de las diferentes cepas priónicas, ni podemos describir con seguridad en qué consisten dichas diferencias estructurales y como se codifican las diferencias fenotípicas y bioquímicas entre las cepas priónicas.

A diferencia de lo que ocurrió con las cepas de scrapie, el estudio y caracterización de las cepas priónicas humanas no se llevó a cabo hasta mucho más tarde. El motivo de esto se debió en gran parte a la imposibilidad de evitar la barrera de especie existente entre humanos y roedores, lo que provocó

que no se dispusiera del modelo animal necesario para llevar a cabo los estudios correspondientes. Con el desarrollo de los modelos transgénicos este problema se solventó y se comenzó a estudiar la gran heterogeneidad fenotípica de las cepas priónicas humanas. Así, la descripción de las variantes clínico-patológicas de las enfermedades priónicas humanas precedió a la caracterización experimental de las cepas mediante el uso de diferentes modelos animales. A pesar de que dicha variedad fenotípica de las EET se conocía desde hace décadas, no fue hasta los noventa cuando se describieron los determinantes moleculares responsables de dicha variabilidad. Estos son principalmente el genotipo *PRNP* y las propiedades fisicoquímicas de los agregados de PrP^{Sc} que se acumulan en el encéfalo. El estudio de estos permitió posteriormente desarrollar la primera clasificación robusta de las enfermedades priónicas humanas, además de la caracterización de las cepas. Se observó que existían diferencias en cuanto a las características bioquímicas de la PrP^{Sc} responsable de diferentes EET humanas, especialmente las implicadas en la CJD esporádica (sCJD, del inglés, sporadic CJD) y el FFI. Esto llevó a una clasificación de la PrP^{Sc} basada en el patrón de movilidad electroforética tras la digestión con PK y en el genotipo *PRNP* asociado a la PrP^{Sc} [247]. Cabe destacar que esta clasificación muestra una alta correlación entre el fenotipo clínico, las características neuropatológicas de los depósitos de PrP^{Sc} y las propiedades bioquímicas de la PrP^{Sc} que conforma la cepa, relacionando la variabilidad fenotípica de la enfermedad con la heterogeneidad de las cepas priónicas humanas existentes [250].

Otro rasgo bioquímico importante para la clasificación de las cepas de priones es el patrón de glicosilación de la PrP. El hecho de que la PrP^C presente en su región C-terminal dos sitios susceptibles de ser glicosilados hace que la PrP^C se pueda encontrar diglicosilada, monoglicosilada y no glicosilada. La proporción de estas tres formas diferencialmente glicosiladas de la PrP^C varía entre cepas, siendo una característica específica de la mayoría de ellas. Tales diferencias se mantienen a través de los países seriados *in vivo* [253] e *in vitro* [102]. Esta propiedad se utiliza ampliamente como indicador del tipo de cepa priónica permitiendo distinguir, entre otras, las cepas de la sCJD y la vCJD [247]. Esto sugiere que el patrón de glicosilación, junto a la conformación de la PrP^{Sc}, estarían implicados en la caracterización y diferenciación de la cepa. Este hecho también ha propiciado que se distingan dos tipos de cepas según su patrón de movilidad electroforética tras la digestión con proteasas: i) las cepas clásicas, que presentan el patrón de tres bandas con diferentes proporciones de cada una de las glicofomas según la cepa y ii) las cepas atípicas que se caracterizan por presentar fragmentos resistentes a PK de entre 6 y 8 kDa, además de las tres bandas características en algunos casos, pero generalmente mal definidas. Por tanto, además de las cepas clásicas, también se han identificado cepas atípicas en humanos, tanto en el GSS [254] como en la VPSPr[33]. Además, también se han identificado este tipo de cepas en pequeños rumiantes con scrapie, como la cepa atípica Nor98 [255].

Es importante mencionar que en el ganado bovino también se han identificado cepas clásicas y atípicas, pero estas últimas no presentan los fragmentos de 6 y 8 kDa característicos y son denominadas así porque, aun presentando un patrón de movilidad electroforético de tres bandas, es distintivo del de la cepa más abundante de BSE, denominada clásica [256].

Por último, otra de las características que aún no se ha llegado a comprender del todo es la capacidad de diferentes cepas de priones de afectar a áreas diferentes del encéfalo, lo que se conoce como tropismo celular de los priones. Diferentes cepas afectan a diferentes áreas del SNC, lo que se traduce en distinto patrón de deposición de los agregados de proteína en el SNC y en la aparición de diferentes signos clínicos. Este fenómeno ha sido ampliamente estudiado mediante el uso de diferentes líneas celulares y cepas priónicas, pero sin embargo no se han podido esclarecer los mecanismos que gobiernan el tropismo celular de cada cepa [257]. Una de las hipótesis propuestas sugiere que el tropismo celular podría estar codificado también en la estructura tridimensional de la PrP^{Sc} y en la ultraestructura de las fibras que la conforman. Así, lo que determinaría la preferencia de cada una de las cepas por determinadas áreas cerebrales, e incluso por determinados órganos extraneuronales, serían las diferencias conformacionales existentes entre ellas [7]. Esto se explicaría por la habilidad que le confiere una determinada estructura para interactuar con moléculas específicas como, por ejemplo, receptores celulares o cofactores celulares específicos [258]. Por consiguiente, el tropismo de cada cepa priónica sería dependiente de un tipo celular específico, en el cual, por ejemplo, se encuentra de forma abundante un cofactor celular específico [259]. Existe otra teoría que intenta explicar este fenómeno basándose en las diferencias que presentan las cepas priónicas en relación a su patrón de glicosilación. Según esta teoría, una PrP^{Sc} con un patrón de glicosilación concreto tenderá a propagarse en zonas del SNC donde la PrP^C presente un patrón de glicosilación similar [260, 261].

3.2. Barrera de transmisión

Una característica importante de las enfermedades priónicas es su transmisibilidad, fenómeno que se conoce desde la década de los años treinta [14]. Desde entonces, la transmisión de los priones, tanto intraespecies como interespecies, ha sido ampliamente estudiada *in vivo* e *in vitro*. Uno de los primeros experimentos que demostraron que la transmisión interespecies era posible fue el llevado a cabo por Gajdusek y colaboradores, demostrando que el kuru se podía transmitir a chimpancés [25]. Por otro lado, la transmisión entre especies diferentes se ha observado también en la naturaleza, teniendo su máximo exponente en la transmisión de la BSE a humanos, originando en estos lo que se conoce hoy en día como la vCJD [40]. La experimentación con modelos animales que expresan PrP de

distintas especies ha permitido el estudio intensivo de este fenómeno, con el objetivo de descifrar los mecanismos implicados y determinar el riesgo de nuevas posibles zoonosis.

La transmisión priónica entre diferentes especies está restringida por la denominada barrera de transmisión, en la que están implicados diferentes elementos; entre otros, la secuencia aminoacídica, tanto de la PrP^{Sc} como de la PrP^C, y la existencia de cepas priónicas [262]. La barrera de transmisión se define como la dificultad que presentan algunas cepas de priones para transmitirse a una especie diferente de la que proceden y se manifiesta habitualmente en forma de tiempos de incubación prolongados y/o tasas de ataque incompletas, es decir, que no todos los animales infectados desarrollan la enfermedad [263]. En determinados casos, la barrera de transmisión existente entre dos especies puede superarse mediante pases o inoculaciones sucesivas en la nueva especie. En los primeros pases se obtienen periodos de incubación más largos y variables que los observados para la transmisión de priones entre animales de una misma especie. Finalmente, ocurre una adaptación del prion a la nueva especie durante los pases seriados y los tiempos de incubación se van acortando a la vez que se obtiene una tasa de ataque mayor o completa. De esta forma, midiendo la reducción del tiempo de incubación que se da entre el primer y el segundo pase, así como el número de pases necesarios para lograr una estabilización del prion en la nueva especie, se puede cuantificar aproximadamente el grado de barrera existente entre dos especies [264-266].

Aunque los factores que controlan la barrera de transmisión entre especies aún no se han descifrado por completo, parece que uno de los factores que tiene un papel clave es la secuencia de aminoácidos de la PrP^{Sc} y la PrP^C. Los estudios con modelos transgénicos [161, 267] y con sistemas libres de células *in vitro* [268] respaldan la idea de que mínimas diferencias en la estructura primaria pueden tener un alto impacto en la eficiencia con la que un prión se transmite entre dos especies. Por ello, la barrera puede surgir por incompatibilidad de la secuencia de aminoácidos de la PrP^{Sc} que constituye el prion y la PrP^C expresada en la nueva especie receptora. Un claro ejemplo de la influencia de la estructura primaria lo muestra el experimento realizado por Prusiner y colaboradores, donde generaron ratones transgénicos que expresaban la PrP^C de hámster junto con la PrP^C endógena de ratón. La inoculación de estos ratones con priones de hámster provocaba la formación de agregados de PrP^{Sc} de hámster, mientras que cuando el prion inoculado era de ratón se generaban agregados de PrP^{Sc} ratón [161]. 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 la PrP^C, como es el caso de la diferente susceptibilidad de los ratones de genotipo *a* y genotipo *b*, cuyas PrP^C difieren en dos aminoácidos y muestran tiempos de incubación muy diferentes en función de la cepa priónica inoculada [269]. Los diversos polimorfismos que aparecen en las PrP^C ovinas, que determinan la susceptibilidad de determinadas cepas de scrapie, también es otro ejemplo

ampliamente estudiado [270]. Por su parte, el tipo de residuo 129 de la PrP^C humana también ejerce una importante influencia en la susceptibilidad a las enfermedades priónicas humanas adquiridas y espontáneas. La posición 129 es un sitio polimórfico de la PrP^C humana y puede codificar una metionina (129M) o una valina (129V), y de forma muy infrecuente una treonina (129T) [271]. La mayoría de los casos de iCJD por uso de hormona del crecimiento contaminada [272], y la totalidad de los casos de vCJD descrito hasta la fecha, salvo una excepción son homocigotos para metionina (M129M) [273, 274].

Sin embargo, los estudios en profundidad de la barrera de transmisión han revelado que es más compleja de lo que se creía inicialmente, ya que se ha observado que distintas cepas de priones originadas en el mismo animal y, por tanto, con la misma secuencia aminoacídica, se transmiten con eficiencias muy distintas [275]. Este es el caso de las cepas HY y DY explicadas anteriormente. Otro estudio ampliamente conocido es aquel que muestra la influencia sobre la barrera de transmisión que se observa con las cepas sCJD y vCJD tras su inoculación en ratones WT y en ratones transgénicos que expresan la PrP^C humana. Mientras que los ratones WT son relativamente susceptibles a la infección con vCJD [276], los ratones transgénicos humanos son relativamente resistentes a la infección con dicha cepa [277]. Por el contrario, las cepas de sCJD son eficientemente transmitidas a ratones transgénicos humanos, mientras que la transmisión de estas cepas a ratones WT está prácticamente imposibilitada por una fuerte barrera de transmisión [40]. Al poseer la misma secuencia de aminoácidos y sin embargo mostrar propiedades de transmisión muy dispares, se determinó que la capacidad de transmisión entre especies también está muy influenciada por la cepa [261]. Por tanto, la barrera de transmisión se rige por una combinación de la secuencia aminoacídica y por la estructura tridimensional de las diferentes cepas, siendo ambos factores determinantes en la interacción inter e intra proteínas y, por tanto, en la propagación priónica.

4. Encefalopatías Espongiformes Transmisibles humanas

Las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles humanas, a pesar de compartir todas ellas las principales características clínico-patológicas, como la espongiosis, la gliosis reactiva y la acumulación de agregados proteicos en el SNC, presentan una gran variabilidad en cuanto a su etiología, rasgos clínicos, áreas afectadas del SNC y patrones bioquímicos de la PrP^{Sc} causante de la enfermedad, pudiendo clasificarse atendiendo a dichas características diferenciales.

Las EET humanas pueden ser clasificadas en tres tipos dependiendo de su etiología: genéticas (también conocidas como hereditarias o familiares), esporádicas (putativamente espontáneas) y adquiridas (Tabla 1). Las EET humanas esporádicas son las formas más comunes, representando un 85-90% del total de los casos. A su vez, dentro de las formas esporádicas, la más común es la sCJD, aunque

también encontramos dentro de este grupo el insomnio letal esporádico (sFI, del inglés, *sporadic Fatal Insomnia*) y la VPSPr, aunque representan formas muy poco frecuentes de la enfermedad. Las formas adquiridas de la enfermedad son las formas menos comunes de todas las EET humanas, representando menos de un 1% del total de casos. En este grupo se engloban la iCJD, la vCJD y el kuru. Por último, las EET genéticas representan el 10-15% restante de las EET humanas y entre ellas se encuentran las CJD genéticas (gCJD, del inglés, *genetic CJD*), el FFI y el GSS [74, 271].

El gen *PRNP* presenta una gran cantidad de polimorfismos relacionados con las diferentes formas de EET y con la susceptibilidad a las mismas en distintas especies. En humanos, el polimorfismo del codón 129 es uno de los más importantes, ya que tiene una fuerte influencia en la susceptibilidad a las EET y en la presentación clinicopatológica de las EET genéticas, esporádicas y adquiridas. El codón 129 puede codificar una metionina (M) o una valina (V), dando lugar a tres alternativas alélicas: homocigotos para metionina (M129M), homocigotos para valina (V129V) y heterocigotos (M129V) [74]. En la población caucasiana, aproximadamente el 55% de los individuos son M129M, el 36% son M129V y el 9% son V129V [278]. Se ha demostrado que la homocigosidad en el codón 129 es un factor de riesgo para las EET esporádicas y adquiridas [279]. Un ejemplo claro de la importancia de este polimorfismo dentro de las EET humanas es la posibilidad de desarrollar gCJD o FFI dependiendo del polimorfismo del codón 129 cuando la mutación D178N se encuentra presente. Así, en los casos en que esta mutación se asocia a la presencia del polimorfismo V129V, el paciente desarrollará gCJD, mientras que si la mutación está asociada a los polimorfismos M129M o M129V el paciente desarrollará FFI [32].

Tabla 1. Clasificación de las EET humanas según su etiología.

Etiología	Nombre de la enfermedad
EET genéticas	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob genética (gCJD) Insomnio Familiar Fatal (FFI) Enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS)
EET adquiridas	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob iatrogénica (iCJD) Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob variante (vCJD) kuru
EET esporádicas	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica (sCJD) Insomnio Familiar esporádico (sFI) Prionopatía con Sensibilidad Variable a Proteasas (VPSPr)

La variabilidad clínica de las EET humanas, además de estar fuertemente influenciada por el polimorfismo 129, también está relacionada directamente con la existencia de diferentes cepas de priones humanos, las cuales están definidas bioquímicamente por patrones y proporciones de fragmentos de PrP^{Sc} en *Western Blot* tras la digestión con PK. Según los estudios elaborados por Parchi y colaboradores, existen dos tipos principales de PrP^{Sc} en el SNC de individuos afectados con una enfermedad priónica, denominados tipo 1 y tipo 2 [280]. Básicamente, tras la digestión con PK, la PrP^{Sc} de tipo 1 muestra en el análisis por *Western Blot* una banda correspondiente a la forma no glicosilada de 21 kDa y la de tipo 2 una banda de 19 kDa. Por tanto, las combinaciones posibles entre el genotipo del codón 129 (M129M, V129V y M129V) y el tipo de PrP^{Sc} (tipo 1 y tipo 2), dan lugar a los seis subtipos (MM1, MV1, VV1, MM2, MV2 y VV2) clínico-patológicos utilizados hoy en día para la clasificación de las EET humanas esporádicas, existiendo solo unas pocas excepciones debido a la complejidad de las enfermedades priónicas [247]. La mayoría de los pacientes solo presentan en su SNC un tipo de PrP^{Sc}, pero en aproximadamente un tercio de los pacientes con gCJD se ha detectado simultáneamente PrP^{Sc} de tipo 1 y tipo 2 [281].

Los síntomas característicos de cada una de las enfermedades priónicas humanas también juegan un papel clave en el diagnóstico diferencial de cada una de ellas. Entre los rasgos clínicos más comunes a todas las EET humanas se encuentran la demencia, anomalías en el habla y la marcha, problemas motores como mioclonos, temblores, rigidez y espasticidad, y cambios del comportamiento como agitación, confusión o depresión. Con el progreso de la enfermedad, los síntomas evolucionan y hacia el final del curso de la enfermedad los pacientes entran en estado de mutismo acinético dejando de responder a estímulos externos. Existen también fenotipos clínicos diferenciales entre las EET humanas, como el insomnio o sueño interrumpido en el sFI e FFI o la disimetría ocular en el GSS [282]. Aun así, las características clínicas de cada enfermedad pueden variar, al igual que el curso y duración de la misma, siendo la duración media de las EET humanas de entre seis meses y dos años [3]. Destaca el caso del GSS, cuya progresión se puede alargar entre 3 meses y 13 años, con una duración media de cinco o seis años [283].

A pesar de las que las EET humanas espontáneas son las formas más comunes de enfermedades priónicas en humanos, a día de hoy no se ha identificado ninguna causa genética ni conexión entre casos que sugieran que se trate de una enfermedad de tipo adquirido, por lo que se supone que los casos de sCJD aparecen de forma espontánea, posiblemente a través mutaciones somáticas en el gen *PRNP* o como consecuencia del malplegamiento *de novo* de la PrP en ausencia de mutaciones asociadas. La incidencia global de la forma más común, la sCJD, es de 1 – 2 casos por millón de habitantes al año [3]. Por otro lado, las EET humanas adquiridas se relacionan con la introducción exógena del agente infeccioso a través de diferentes prácticas médicas (iCJD) o por la ingestión de

material contaminado, responsable del origen de la vCJD y el kuru. Algunos ejemplos de iCJD serían los trasplantes de duramadre o córnea procedentes de donantes enfermos, el uso de material quirúrgico contaminado o el tratamiento con hormona del crecimiento obtenida a partir de hipófisis de cadáveres [284]. Hasta la fecha, se han descrito en todo el mundo 492 casos de iCJD, la mayoría de ellos relacionados con el uso de hormona de crecimiento o implantes de duramadre contaminados con PrP^{Sc} [285]. La vCJD, que surgió por la ingesta de carne o derivados contaminados con el SNC de bóvidos con BSE, y el kuru, relacionado con las prácticas canibalísticas de los Fore completan el grupo de EET humanas adquiridas. Además, cabe destacar la existencia de 4 casos de vCJD contraídos a partir de transfusiones sanguíneas procedentes de donantes que más tarde desarrollaron la misma enfermedad [286]. Por último, las EET humanas genéticas están directamente relacionadas con mutaciones autosómicas dominantes en el gen que codifica la PrP (*PRNP*). Han sido descritas más de 40 mutaciones diferentes en el gen *PRNP* relacionadas con el desarrollo de alguna de las formas genéticas de las EET. Entre ellas existen mutaciones puntuales, codones de terminación prematuros que provocan PrP incompletas e inserciones/deleciones en la zona de octarepeticiones [74]. Aunque en la literatura científica o durante las secuenciaciones masivas de genomas humanos se han descrito más de 80 variantes de la *PRNP* sospechosas de ser patogénicas, diversos estudios indican que es muy probable que muchas de ellas sean benignas o sean mutaciones con baja penetrancia. Según los datos actuales, sólo cinco mutaciones puntuales en el gen *PRNP* son responsables del 85% de los casos de EET humanas genéticas: E200K, V210I, V180I, D178N y P102L. Las cuatro primeras mutaciones están asociadas con gCJD, mientras que la última está asociada al GSS [287]. La mutación D178N es la única mutación que se asocia al FFI y solo cuando está presente el polimorfismo M129M o M129V [32].

5. Sistemas de propagación *in vitro* de priones

Uno de los mayores retos dentro del campo de las enfermedades priónicas se fundamenta en el desarrollo de sistemas y modelos capaces de replicar fielmente todas las características de las EET humanas.

Uno de los grandes avances en este sentido fue el diseño e implementación de sistemas *in vitro* e *in cellula* capaces de mimetizar el proceso de propagación que tiene lugar *in vivo*. El desarrollo de estos sistemas ha permitido reducir el tiempo y los costes asociados a los experimentos realizados con modelos animales. Sin embargo, aunque en estos modelos se pueden estudiar algunos aspectos de la patología priónica, los modelos animales siguen siendo necesarios para el estudio de las características clínicas y neuropatológicas. Además, idealmente los compuestos anti-priónicos con alto potencial de convertirse en una futura terapia contra las EET humanas deberán ser testados en última instancia en modelos transgénicos humanizados [88]. A pesar de ello, la mayoría de los modelos animales

disponibles hoy en día no recapitulan todas las características clínico-patológicas y bioquímicas de la enfermedad humana, siendo esta una importante limitación. Por ejemplo, la mayoría de los intentos para modelar las EET genéticas mediante modelos transgénicos han fracasado, obteniéndose un gran número de líneas de ratones transgénicos que expresan la PrP humana mutada pero que no muestran el fenotipo correspondiente [288].

Desde la infección exitosa de la línea celular de neuroblastomas de ratón N2a con el inóculo RML en 1987 [289], se han identificado más de 20 líneas celulares de diferentes linajes que permiten propagar determinadas cepas priónicas. Sin embargo, la infección persistente de muchas líneas celulares con priones ha sido imposible. Los niveles de expresión de PrP^C no se correlacionan con la susceptibilidad a la infección y solo un número limitado de cepas priónicas han podido ser propagadas con éxito en células [290]. En un reciente estudio realizado con 33 líneas celulares diferentes y 5 cepas de priones distintas, solo se consiguió infectar persistentemente dos líneas celulares: la línea celular N2a con la cepa priónica RML y la línea celular de riñón bovino PES con scrapie de oveja [291]. No obstante, el desarrollo de las técnicas basadas en líneas celulares ha contribuido en gran medida a la descripción de diferentes mecanismos que participan en la propagación y neurotoxicidad de los priones [292]. De igual forma, el testado y descripción de compuestos con actividad anti-priónica es uno de los principales valores de estos modelos. Un gran número de compuestos han sido identificados mediante sistemas *in vitro*, más alejados de la situación real que tiene lugar en el SNC, y han sido posteriormente validados mediante diferentes modelos de propagación *in cellula* [293-295]. Sin embargo, de todos los compuestos con actividad anti-priónica detectados *in cellula* ninguno ha llegado a la práctica clínica por su baja eficiencia en EET humanas u otros problemas asociados. Una de las posibles razones se debe a que la actividad anti-priónica del compuesto varía dependiendo de la cepa utilizada en el modelo. Desafortunadamente, no se ha conseguido propagar ninguna cepa de prion humano en líneas celulares, lo que solventaría problemas derivados de la especificidad de cepa. Aunque sí que se ha conseguido que determinadas líneas celulares no humanas sean susceptibles a la infección con priones humanos adaptados a ratones WT. No obstante, la propagación de una cepa priónica a un nuevo hospedador puede alterar las características iniciales de la cepa y, por tanto, no es conveniente para la detección de compuestos anti-priónicos específicos para humanos [288]. Además, los métodos *in cellula* requieren de amplia experiencia previa y tienen altos costes comparados con los métodos puramente *in vitro*. También la necesidad de técnicas bioquímicas como el *Western Blot* o el *Dot Blot* para detectar los niveles de PrP^{Sc} dificultan el uso de estos sistemas como método de testado masivo.

El desarrollo de esta tesis doctoral se ha basado en el uso de técnicas *in vitro*, fundamentalmente la PMSA. Por tanto, describiremos en mayor profundidad los diferentes sistemas *in vitro* que más

información han aportado sobre las características biológicas de los priones y su uso en el cribado de moléculas con actividad anti-priónica.

5.1. Sistemas de propagación *in vitro*

Con el objetivo no solo de estudiar en detalle la naturaleza del agente infeccioso, sino también como métodos diagnósticos, así como para la búsqueda de compuestos con actividad anti-priónica, se han desarrollado distintos sistemas *in vitro* que mimetizan el proceso de malplegamiento que ocurre *in vivo*. Estos métodos han demostrado reducir significativamente los tiempos y el coste al compararlos con los modelos animales o los modelos celulares.

5.1.1. Ensayo de conversión libre de células

El ensayo de conversión libre de células (del inglés, *cell-free conversion assay*) desarrollado por Caughey y colaboradores a principio de los noventa constituye el primer sistema *in vitro* de propagación de priones. Para su desarrollo, se basaron en la purificación de PrP^C a partir de cultivos celulares y de PrP^{Sc} a partir de encéfalos. Tras la desnaturalización de la PrP^{Sc} mediante el uso de agentes caotrópicos y su posterior renaturalización por dilución de dicho agente, se observó que la PrP^{Sc} renaturalizada (utilizada como semilla) era capaz de inducir el malplegamiento de la PrP^C (utilizada como sustrato). La PrP^C había sido previamente marcada radiactivamente para facilitar su detección [92]. Esto supuso la primera demostración de que la PrP^{Sc} es capaz de malplegar la PrP^C sin la interacción de ningún otro componente, como predijo la hipótesis de “solo proteína”. Además, este nuevo sistema *in vitro* se utilizó para estudiar los mecanismos que subyacen a la especificidad de cepa y la especificidad de especie durante la propagación priónica [296, 297], así como para estudiar el mecanismo de acción de diferentes compuestos anti-priónicos, como las porfirinas y phthalocianinas, el Congo Red o la curcumina [298-301]. Sin embargo, la principal desventaja de esta técnica es su bajo rendimiento y que la PrP^{res} obtenida no es infecciosa *in vivo* [302].

5.1.2. Amplificación cíclica de proteínas malplegadas: PMCA

Basándose en la demostración previa de que la PrP^C se podía malplegar a partir de la PrP^{Sc} en un sistema *in vitro* y con el objetivo de mejorar el ensayo de conversión libre de células, Soto y colaboradores desarrollaron una novedosa metodología basada en el uso de la sonicación para conseguir por primera vez *in vitro* priones *bona fide* [93]. Esta demostración supuso el desarrollo de la técnica PMCA, la cual se basa en el principio de polimerización dependiente de nucleación para la propagación de amiloides. Conceptualmente, la PMCA es similar a la técnica PCR (del inglés *Polymerase Chain Reaction*), donde a partir de una hebra de DNA molde se pueden obtener millones de copias

idénticas en un corto periodo de tiempo gracias a una reacción que ocurre de forma cíclica. Durante estas dos últimas décadas, el sistema de PMCA se ha ido mejorando con el objetivo de aumentar su sensibilidad, especificidad y rendimiento [94, 303-305]. El sistema se basa en un ciclo repetitivo de incubación/sonicación que mimetiza *in vitro* el proceso de malplegamiento y propagación que ocurre *in vivo* pero con una cinética acelerada. En la fase de incubación, una pequeña cantidad de PrP^{Sc} es incubada en presencia de un exceso de PrP^C presente en homogenizados de encéfalo, la cual se malpliega dando lugar a nueva PrP^{Sc}. Las nuevas moléculas de PrP^{Sc} son reclutadas por las fibras de PrP^{Sc}, formando grandes agregados. A continuación, un ciclo de sonicación mediante ultrasonidos se cree que disgrega las fibras amiloides de PrP^{Sc} formadas durante la fase de incubación, generando nuevos núcleos de polimerización para la siguiente fase de incubación. Durante los sucesivos ciclos de incubación y sonicación se incrementa de forma exponencial la cantidad inicial de PrP^{Sc} usada como semilla [303], hasta obtener finalmente una cantidad de PrP^{Sc} significativamente mayor que la utilizada inicialmente. Así, cantidades de PrP^{Sc} que eran indetectables por métodos bioquímicos como el *Western Blot* pueden ser amplificadas mediante esta técnica y ser fácilmente detectadas. La importancia de la PMCA, además, reside en que se ha demostrado que es capaz de mimetizar las propiedades fundamentales de la propagación priónica que ocurren *in vivo*, siendo capaz de replicar diferentes cepas de priones manteniendo sus características determinantes. Así, la nueva PrP^{Sc} generada mediante PMCA conserva las propiedades bioquímicas y biológicas de la semilla de PrP^{Sc} inicial, destacando su infectividad *in vivo* [94]. Este sistema *in vitro* ha sido utilizado para investigar el papel de los cofactores en la propagación priónica [258, 306, 307], para estudios de barrera de transmisión [308, 309] y ha permitido la obtención de PrP^{Sc} para estudios estructurales [106, 187], entre otras aplicaciones. Además, cabe recordar que la PMCA nació con el objetivo inicial de ser usada para el diagnóstico de las EET a partir de muestras de tejidos o fluidos corporales donde las cantidades de PrP^{Sc} son indetectables. Desde su invención, se ha ido mejorando permitiendo finalmente la detección ultrasensible de priones en diferentes muestras biológicas, como sangre, orina y líquido cefalorraquídeo [310-313].

La PMCA también tuvo un papel clave en la demostración de la validez de la hipótesis de “solo proteína”. Los estudios realizados con esta técnica permitieron constatar que la nueva PrP^{Sc} generada gracias a los ciclos de incubación/sonicación es capaz de propagar su malplegamiento de forma autocatalítica a nuevas moléculas de PrP^C presentes en el sustrato [314]. La posterior obtención de priones mediante PMCA utilizando sustratos basados exclusivamente en PrP recombinante, sin la necesidad de ningún componente derivado de mamífero, fue de vital importancia para la confirmación de la teoría [97].

Otro de los avances importantes en esta área fue el desarrollo de la PMCA recombinante (rec-PCMA), la cual en lugar de utilizar PrP^C purificada de cultivos celulares o encéfalos, utiliza PrP recombinante (rec-PrP) purificada de *E. coli*. A pesar de las características que la diferencian de la PrP^C de mamíferos (ausencia de glicosilaciones y de anclaje GPI), se ha conseguido obtener priones sintéticos o recombinantes *bona fide* mediante el uso combinado de rec-PrP y PMCA. Sin embargo, las PrP^{res} obtenidas mediante rec-PMCA presentan propiedades biológicas heterogéneas, destacando una infectividad limitada en muchos casos. Uno de los primeros estudios llevados a cabo con rec-PrP y PMCA fue el desarrollado por Kim y colaboradores, donde demostraron la obtención de priones recombinantes utilizando PrP^{Sc} encefálica como semilla [97]. En el mismo año, el grupo de Ma demostró mediante el uso de rec-PMCA la obtención *de novo* de priones recombinantes, siendo este uno de los experimentos más importantes realizados hasta la fecha mediante esta técnica. Mediante el uso de un sustrato basado en rec-PrP, sin ninguna semilla de PrP^{Sc} inicial, y complementado únicamente con RNA y lípidos sintéticos como cofactores, obtuvieron de forma espontánea un prion recombinante que mostró niveles de infectividad *in vivo* semejantes a los priones de mamíferos al ser inoculados en ratones WT [98]. A partir de estos experimentos, se han obtenido mediante PMCA diferentes priones recombinantes con capacidad infecciosa, como los generados por Suppattapone y colaboradores pero esta vez usando como cofactor la fosfatidiletanolamina [315], o los generados por Castilla y colaboradores utilizando diferentes cofactores [258]. Esto demuestra que la generación de priones artificiales mediante PMCA en un entorno controlado bien definido es posible y que estos pueden presentar niveles de infectividad similares a los priones de mamíferos.

Por último, la PMCA es también un excelente sistema para la búsqueda de compuestos con actividad anti-priónica, ya que se ha demostrado que mimetiza las principales etapas de la propagación de priones *in vivo*. Gracias a su uso se han identificado compuestos que inhiben la formación de PrP^{Sc} *in vitro* [316]. Sin embargo, los requerimientos de la PMCA, como los complejos y costosos sistemas de sonicación, y la necesidad de técnicas bioquímicas como la digestión con proteasas y el *Western Blot* para detectar la reducción en la propagación priónica dificultan su uso para la búsqueda masiva de compuestos con actividad anti-priónica.

5.1.3. Conversión inducida por agitación en tiempo real: RT-QuIC

Otras de las técnicas de propagación de priones *in vitro* de gran relevancia es la técnica denominada conversión inducida por agitación en tiempo real (RT-QuIC, del inglés *Real Time – Quaking Induced Conversion*). Este nuevo sistema fue desarrollado por Caughey y colaboradores como un nuevo método *in vitro* para la detección priónica y es conceptualmente similar a la PMCA, pero en lugar de usar sonicación usa agitación como fuente de energía y Tioflavina T (ThT, del inglés *Thioflavine*

T, compuesto que mediante unión a amiloides sufre un aumento en la intensidad de fluorescencia emitida) para monitorizar la formación de fibras amiloides en tiempo real. El sustrato en esta técnica está formado exclusivamente por rec-PrP, ThT, sales y detergentes [317]. El uso de ThT junto con la utilización de placas de 96 pocillos y un lector de placas para llevar a cabo la reacción y la medición ha permitido la automatización de la técnica. Todas estas características hacen que sea más rápida, sensible y reproducible que la PMCA en lo que se refiere a la detección de PrP^{Sc}. Actualmente, es la principal técnica propuesta para convertirse en herramienta de diagnóstico clínico de EET humanas y animales. La RT-QuIC es capaz de detectar con alta sensibilidad y especificidad cantidades ínfimas de PrP^{Sc} en diferentes muestras biológicas, como líquido cefalorraquídeo [318], raspados nasales [319], orina [320], heces [321] y saliva [322]. Numerosos estudios utilizando una diversidad de muestras biológicas procedentes de distintas EET humanas han demostrado que la RT-QuIC presenta una sensibilidad cercana al 100% con una especificidad casi siempre del 100%, motivos por los que se está generalizando su uso en la práctica clínica [323]. Debido a su enorme potencial como herramienta diagnóstica, la RT-QuIC se está adaptando y optimizando para el diagnóstico de otras enfermedades neurodegenerativas relacionadas con el malplegamiento proteico, como las sinucleinopatías y las taupatías [324].

Sin embargo, una de las principales diferencias entre la PMCA y la RT-QuIC es que se ha demostrado que la PrP^{res} generada mediante RT-QuIC no es infecciosa *in vivo* [325]. Por tanto, la RT-QuIC no recapitula las características esenciales de un prion *bona fide*, por lo que limita el uso de esta técnica para estudiar los procesos de propagación priónica o para la generación de PrP^{res} destinada a estudios estructurales. Sin embargo, la ausencia de infectividad del producto de RT-QuIC se considera una ventaja práctica para su uso como herramienta de diagnóstico. Aun así, esta técnica ha sido usada para testar la eficacia anti-priónica de diversos compuestos, como la acridina, el dextrano, el ácido tánico y las trimetilchalconas [326, 327], siendo incluso propuesta para el cribado masivo de bibliotecas de compuestos con posible actividad anti-priónica [328]. No obstante, existe otro posible problema derivado del uso de ThT denominado desactivación fluorescente o *quenching*. Es necesario conocer el espectro de excitación y emisión de los compuestos a testar, ya que podrían solaparse con los espectros de excitación y emisión de la ThT. Por tanto, podríamos encontrarnos ante la situación de que el efecto anti-priónico del compuesto testado no sea real, sino que se deba a un artefacto debido al solapamiento de dichos espectros [329]. Por tanto, la imposibilidad de trabajar con priones *bona fide* ha lastrado su uso para el testado de compuestos, ya que se trata de un sistema poco predictivo de la eficacia anti-priónica de los compuestos *in vivo*.

5.1.4. Amplificación de proteínas malplegadas por agitación: PMSA

Con el objetivo de aprovechar las ventajas de la PMCA y la RT-QuIC con el fin de solventar algunas de las desventajas de dichas técnicas, se ha desarrollado recientemente la técnica denominada amplificación de proteínas malplegadas por agitación (PMSA, del inglés *Protein Misfolding Shaking Amplification*) [330]. El uso de esta nueva metodología, desarrollada recientemente en nuestro laboratorio, es parte fundamental del desarrollo de esta tesis doctoral. Uno de los problemas subyacentes de la PMCA debido a la falta de conocimiento de los eventos moleculares que tienen lugar en ella y a la dificultad de controlar los parámetros de sonicación, es la generación de PrP^{res} con distintas propiedades biológicas. Esto podría llevar a la formación de mezclas heterogéneas de cepas principalmente debidas al uso de homogeneizados de encéfalo [258]. Esto ha llevado a la obtención de PrP^{res} altamente infecciosa y PrP^{res} no infecciosa usando el mismo sistema de PMCA, lo que dificulta los subsecuentes estudios estructurales y bioquímicos [177, 331]. Además, el uso de grandes equipos de sonicación, además de limitar la escalabilidad y la necesidad de emplear técnicas de *immunoblot* para la visualización de los resultados, dificultan su uso para la búsqueda masiva de compuestos anti-priónicos. Por el contrario, la RT-QuIC presenta características de reproducibilidad y escalabilidad que la convierten en idónea para el testado masivo de posibles compuestos anti-priónicos, pero la ausencia de infectividad de la PrP^{res} que se origina hace que su utilidad para dicho objetivo sea reducida. Así, la PMSA es una nueva metodología que supera los problemas de complejidad, variabilidad y escalabilidad de los sistemas anteriores y además presenta la ventaja de que puede ser implementada en cualquier laboratorio con un equipo básico.

Esta nueva técnica se basa en el uso de agitación en lugar de sonicación como fuente de energía. No obstante, la agitación se administra mediante el uso de sistemas *Thermomixer* o *Monoshake*, siendo esta una característica diferencial respecto a la RT-QuIC. Otra de las diferencias es la composición del sustrato, el cual es significativamente más simple al estar formado únicamente por rec-PrP, dextrano sulfatado, detergentes y sales. El sistema se ha desarrollado utilizando un prion *bona fide* recombinante altamente infeccioso de topillo rojo procedente de PMCA, demostrándose que la nueva PrP^{res} propagada mediante PMSA mantiene las características fundamentales de un prion *bona fide*, como son la infectividad y la capacidad de propagación infinita. Sin embargo, este procedimiento puede ser adaptado a la propagación de cepas de priones de diferentes especies. Por otro lado, el uso de dextrano sulfatado como cofactor limita la generación de PrP^{res} estructuralmente heterogéneas, permitiendo por primera vez la generación de priones recombinantes altamente infecciosos y homogéneos. Para mejorar la eficiencia de la propagación del malplegamiento, el sistema utiliza partículas esféricas de zirconio-sílice de 1,0 mm. La medición de los resultados no es a tiempo real, por lo que el sustrato no contiene ThT. En este sentido, se puede hacer uso tanto de técnicas bioquímicas

como el *Western Blot* o de ThT para la detección de fibras amiloides, lo cual permite el cribado de un gran número de compuestos de forma rápida y fiable [330]. Todas estas características la convierten en una metodología con un alto potencial para la obtención de material con las características deseadas para los estudios estructurales, además de ser un sistema ideal para el testado masivo de bibliotecas de compuestos con posible actividad anti-priónica. Esto último ya ha sido demostrado mediante el testado de una biblioteca de 2500 compuestos donde se encontraron 3 nuevas moléculas con alto potencial inhibidor de la propagación priónica en topillo rojo [332]. El enorme potencial para el cribado masivo de compuestos junto con la posibilidad de adaptar el sistema a priones humanos, lo han convertido en el principal objetivo de esta tesis doctoral.

6. Estrategias terapéuticas contra las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles humanas

En la actualidad, no existen tratamientos que modifiquen el desenlace de las EET humanas, siendo la única posibilidad el uso de tratamientos paliativos de los síntomas. La totalidad de las aproximaciones terapéuticas descritas en modelos *in vitro*, *in cellula* e *in vivo* han fracasado tras ser testadas en ensayos preclínicos o clínicos o han mostrado resultados modestos [333, 334]. La aceptación de que las enfermedades priónicas estaban causadas por un virus lento hizo que los primeros tratamientos en ser probados fuesen antivirales, como el aciclovir [335], la amantadina [336] o el interferón [337], siendo todos ellos ineficaces contra las EET humanas. Una vez que se descartó su origen vírico, se dejaron de utilizar antivirales como posibles terapias y el tratamiento se enfocó en las manifestaciones neurológicas, destacando el uso de antidepresivos [338], anticonvulsiantes [339] y analgésicos [340]. Muchos de ellos se siguen usando hoy en día como tratamientos paliativos de los síntomas.

Actualmente las distintas estrategias terapéuticas que se están estudiando activamente se están centrando principalmente en evitar la propagación priónica, así como sus efectos neurotóxicos. Estos estudios se están llevando a cabo a través de una diversidad de metodologías: 1) reducción de la cantidad de PrP^C mediante inhibición de su expresión o mediante el aumento de su degradación, 2) estabilización de la PrP^C para evitar su malplegamiento, 3) inhibición de la interacción PrP^C-PrP^{Sc}, 4) inhibición de la formación de oligómeros y agregados de PrP^{Sc}, 5) aumento de la degradación de la PrP^{Sc} o 6) estimulación del sistema inmunitario para reducir su propagación y promover su eliminación (Figura 6) [333, 341].

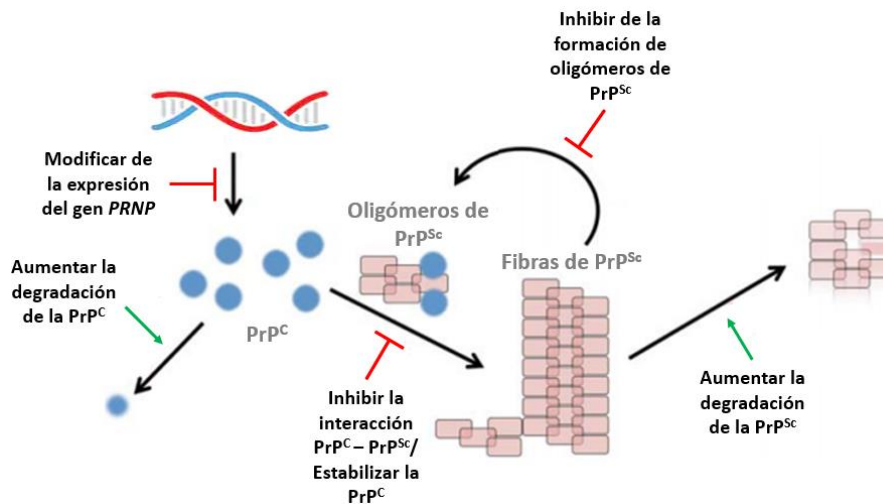


Figura 6. Representación esquemática de las principales estrategias terapéuticas que están siendo estudiadas activamente en la actualidad. (Modificado de [341]).

6.1. Estrategias basadas en el sistema inmunitario

A diferencia de otras enfermedades infecciosas, el sistema inmunitario apenas interviene en la defensa contra las EET. Debido a que la secuencia aminoacídica de la PrP^C y la PrP^{Sc} son idénticas, el sistema inmunitario no genera una respuesta robusta contra la infección por priones, fenómeno conocido como autotolerancia. Sin embargo, se hipotetiza que el malplegamiento de la PrP^C para dar lugar a la PrP^{Sc} puede llevar a la formación de nuevos epítomos conformacionales. Estos nuevos epítomos podrían ser reconocidos por el sistema inmunitario y poner en marcha una respuesta humoral que culminaría con la generación de autoanticuerpos dirigidos contra la isoforma patogénica. Basados en esta hipótesis, Aguzzi y colaboradores llevaron a cabo un estudio para determinar la presencia de dichos autoanticuerpos en individuos portadores de mutaciones patogénicas en el gen *PRNP*, determinando que las variantes patogénicas de la PrP no estimulan la respuesta inmunitaria mediada por autoanticuerpos, no estando asociados con la aparición de la enfermedad [342]. Sin embargo, la ausencia de respuesta inmunitaria no es total, ya que se ha descrito un aumento de la activación de la microglía en el SNC de pacientes, siendo la única manifestación clara de una reacción del sistema inmunitario contra las enfermedades priónicas. La inhibición farmacogenética de la microglía provocó un acortamiento de los tiempos de incubación y un aumento de depósitos de PrP^{Sc} en el SNC [246, 343]. Por tanto, la estimulación de la respuesta microglial frente a las EET humanas constituye otra de las estrategias terapéuticas en estudio, por ejemplo, mediante el uso de vacunas contra la PrP^{Sc}. De esta forma se conseguiría estimular la respuesta inmunitaria contra la PrP^{Sc} generando anticuerpos contra la isoforma malplegada. En este sentido, la inmunización activa con PrP de origen recombinante ha sido explorada para generar inmunocompetencia contra los priones. La utilización de PrP dimérica ha generado la producción de autoanticuerpos en modelos de ratón, demostrando más tarde su

eficacia en modelos celulares [344]. Debido a que la mayoría de anticuerpos no pueden alcanzar el SNC por la presencia de la barrera hematoencefálica que lo protege, estas estrategias solo funcionarían como método profiláctico contra priones exógenos y serían ineficaces contra EET genéticas o esporádicas.

La inmunización pasiva con anticuerpos monoclonales dirigidos contra la PrP^C y/o agregados de PrP^{Sc} constituyen otras de las estrategias contra las EET humanas. Se ha demostrado que estos anticuerpos generados de forma exógena son efectivos en modelos celulares y animales [345, 346]. El mecanismo de acción de estos anticuerpos monoclonales se basa en unirse a la PrP^C y estabilizar su conformación nativa y/o bloquear la interacción PrP^C-PrP^{Sc}, evitando de cualquiera de ambas formas su conversión a la isoforma patogénica [347]. La inmunización pasiva de modelos murinos de scrapie con dos anticuerpos monoclonales, ICSM18 e ICSM35, demostraron que esta estrategia podría ser efectiva contra las EET humanas. Esta es la base del ensayo clínico de uso compasivo PRN100 liderado por el Dr. Collinge en Reino Unido. En este ensayo clínico se ha administrado intravenosamente la versión humanizada del anticuerpo monoclonal ICSM18, denominado PRN100, a un número limitado de pacientes afectados con CJD que se encontraban generalmente en estadios avanzados de la enfermedad. En la actualidad, 4 de 6 pacientes tratados con PRN100 han fallecido. [348, 349]. Cabe destacar que existe una fuerte controversia acerca del uso de anticuerpos monoclonales como estrategia contra las enfermedades priónicas, ya que disponemos de evidencias que indican que los anticuerpos dirigidos contra el dominio globular de la PrP pueden provocar una neurodegeneración similar a la que se observa en los pacientes con EET [350]. Este sería el caso del anticuerpo ICSM18 y su versión humanizada PRN100, dirigidos contra el epítipo α 1-3 de la región globular de la PrP^C. Sin embargo, otros estudios realizados con estos anticuerpos en modelos animales indican que no existe toxicidad aguda a nivel del SNC relacionada con su administración [351]. Además, con esta estrategia persiste el problema de la barrera hematoencefálica que restringe el paso de macromoléculas al SNC. No obstante, se ha sugerido que aunque solo una pequeña cantidad de los anticuerpos administrados alcancen el SNC, estos serían suficientes para ejercer su acción contra la proteína priónica.

6.2. Estrategias basadas en la reducción de la cantidad de PrP^C

La terapia génica es otra de las aproximaciones terapéuticas que ha mostrado tener potencial para luchar contra las EET humanas. Se han obtenido resultados positivos mediante el uso de lentivirus que portan un RNA de interferencia (RNAi) para silenciar el gen *PRNP* y así inhibir la expresión de PrP^C en modelos *in vivo* [352, 353]. Esta metodología utiliza vectores virales, como los lentivirus, para poder administrar el RNAi en el SNC y que estos puedan penetrar en las células. Un problema asociado al uso de vectores virales es que no se distribuyen correctamente por todo el encéfalo y no logran infectar a

un número de neuronas suficientes como para mejorar los signos clínicos de los animales y prolongar de forma significativa su vida [352]. Con el objetivo de superar esta limitación, Minikel y colaboradores han trabajado en el desarrollo de una nueva estrategia terapéutica para las EET humanas conocida como terapia antisentido, la cual está arrojando resultados prometedores. Esta nueva aproximación se basa en el diseño y desarrollo de oligonucleótidos antisentido (ASO, del inglés, *AntiSense Oligonucleotides*) con la capacidad de unirse de forma complementaria y específica a un RNAm determinado. De este modo, se han desarrollado varios ASO cuya diana es el RNAm del gen *PRNP*, con el objetivo de disminuir la expresión de la PrP^C [354]. Conceptualmente, los ASO provocan el mismo efecto que los RNAi: la disminución de la expresión de la PrP^C, sin embargo, presentan características diferentes. Los ASO no necesitan vectores virales para su administración, ya que pueden ser administrados directamente en el SNC y penetrar en las células, alcanzando el núcleo y ejerciendo su efecto sin la limitación que presentaban los RNAi. Además, existen diversos mecanismos por los cuales pueden ejercer su acción, siendo los más importantes la degradación del RNAm mediante el reclutamiento de la RNasa H o la modulación del *splicing* de RNA a través de su unión al mismo, haciendo que un exón se excluya o incluya de forma preferencial [355]. Por último, cabe destacar que aunque se ha demostrado que la eliminación de la PrP^C en modelos animales no provoca un cambio de fenotipo evidente [356], los efectos de la disminución de una proteína ubicua y conservada en la evolución de los mamíferos a largo plazo podría ser perjudicial [114].

6.3. Estrategias basadas en la degradación de PrP^{Sc}

El estudio de las distintas vías celulares implicadas en la eliminación de proteínas malplegadas o agregadas ha demostrado su interés como posibles dianas para desarrollar nuevas aproximaciones terapéuticas contra las EET humanas. La potenciación de los sistemas de eliminación de desechos celulares en el SNC ha mostrado resultados positivos. En este sentido, Muth y colaboradores han demostrado en modelos murinos que aumentar la actividad microglial mediante el uso de retrovirus provoca un aumento de la eliminación de los priones a través de la reducción de los niveles de PrP^{Sc} [357]. De igual forma, potenciar la actividad lisosomal también provoca una eliminación moderada de los priones, sugiriendo que podría constituirse también como un posible tratamiento [358-361]. La inhibición mediante fármacos o modificaciones genéticas de la respuesta a proteína malplegadas (UPR, del inglés, *Unfolded Protein Response*) también ha sido evaluada como posible terapia contra las enfermedades priónicas [362, 363]. Previamente se describió que existía un aumento de esta respuesta UPR en modelos animales de varias enfermedades neurodegenerativas [364-366], entre ellas las EET [363]. La administración de un fármaco inhibidor de la UPR en ratones inoculados con la

cepa RML consiguió un claro retraso en el progreso de la enfermedad y en las lesiones histopatológicas [367].

6.4. Estrategias basadas en compuestos químicos con actividad anti-priónica

Ante el desconocimiento de los mecanismos moleculares que rigen las enfermedades priónicas, el desarrollo de terapias con diseño racional es muy limitado. Por ello, una de las opciones que mayor repercusión tiene en la búsqueda de posibles terapias para estas enfermedades se basa en la detección de compuestos químicos que aun con mecanismos desconocidos, puedan tener algún efecto sobre la propagación priónica o la neurotoxicidad asociada a la misma. El desarrollo y utilización de los sistemas de propagación de priones *in vitro*, *in cellula* y de modelos *in vivo* han permitido la identificación de varios compuestos con actividad anti-priónica, alguno de los cuales se utilizan en la actualidad como medicamentos para otras patologías. Algunos de estos compuestos son antibióticos como la anfotericina B o la doxiciclina, un antimalárico como la quinacrina, neurolépticos como las fenotiazinas, analgésicos no opioides como la flupirtina o el pentosan polisulfato que se usa ampliamente para tratar trombos y cistitis intersticiales [368]. Sin embargo, a pesar de tener todos ellos perfiles toxicológicos aceptables, ya que son usados en la práctica clínica para otras patologías, solo la doxiciclina, la flupirtina, la quinacrina y el pentosan polisulfato han sido evaluados en ensayos clínicos robustos como terapia para las EET humanas [369]. La eficacia de la flupirtina se testó en un ensayo clínico aleatorizado y se demostró que mejoraba el rendimiento cognitivo de pacientes pero no afectaba al tiempo de supervivencia de los mismos [340]. Por su parte, el efecto anti-priónico de la quinacrina ha sido evaluado mediante estudios observacionales en dos ensayos clínicos. Uno de ellos llevado a cabo en Reino Unido (PRION-1), que incluyó diferentes formas de CJD [370], y otro ensayo clínico de doble ciego controlado con placebo en EEUU, donde no se detectaron diferencias en la mortalidad entre los grupos tratados y no tratados [371]. El pentosan polisulfato prolongó la supervivencia de enfermos con vCJD en estudios observacionales, aunque no se reportaron beneficios clínicos significativos [372, 373]. En un estudio con 11 pacientes, que incluían diferentes formas de CJD y algún caso de GSS, no se encontraron mejoras clínicas de los pacientes, además de detectarse varios problemas con la ruta de administración, en este caso intraventricular [374]. De todos ellos, la doxiciclina es la que ha mostrado los resultados más interesantes, estando en marcha aún hoy en día uno de los ensayos clínicos con este compuesto, el cual empezó en 2012 y se prevé que finalice en 2023 [375]. Se trata del primer ensayo clínico contra las EET humanas de carácter preventivo, en el cual participan personas presintomáticas portadoras de la mutación que predispone al desarrollo de FFI. Anteriormente, la doxiciclina se administró a pacientes con CJD de forma compasiva y los análisis retrospectivos de los datos indicaron una ligera extensión del tiempo de supervivencia [376]. Posteriormente, los análisis de

eficacia de un ensayo clínico de doble ciego de fase 2 con más de 100 pacientes con sCJD mostraron que no existían diferencias entre el grupo tratado con doxiciclina y el grupo tratado con placebo [377]. Sin embargo, recientemente otro ensayo clínico aleatorizado pero con pacientes de sCJD en etapas tempranas de la enfermedad ha mostrado un incremento del tiempo de supervivencia, lo que parece indicar que el efecto beneficioso de la doxiciclina depende de la etapa de la enfermedad en la que se encuentre al paciente [378]. Por tanto, la intervención terapéutica con este compuesto en etapas presintomáticas podría retrasar la aparición de la enfermedad y prolongar la salud del paciente. Esta es la base fundamental del primer ensayo clínico con carácter preventivo realizado en personas portadoras de la mutación asociada al FFI. Como se ha indicado anteriormente, el estudio sigue en marcha y se ha establecido que se considerará efectivo el tratamiento con doxiciclina si no más de tres individuos desarrollan FFI durante el periodo de estudio [375].

Por tanto, y hasta que se conozcan en mayor profundidad los mecanismos moleculares que rigen las enfermedades priónicas, la estrategia que ha dado mejores resultados y con mayor potencial para conseguir una terapia contra las EET humanas es la búsqueda masiva de moléculas mediante modelos *in vitro* e/o *in cellula*, normalmente de pequeño tamaño, capaces de interactuar con la PrP^C o la PrP^{Sc} e inhibir el proceso de malplegamiento. Hasta hace poco, los principales esfuerzos realizados estaban dirigidos a la búsqueda de agentes terapéuticos contra la PrP^{Sc}, ya que es la estrategia más intuitiva debido a que es la isoforma patológica más relevante de la PrP. Sin embargo, el no conocer su estructura tridimensional y la heterogeneidad conformacional de las cepas de priones son los principales problemas relacionados con este enfoque. Muchos compuestos con actividad anti-priónica descubiertos en las últimas décadas han mostrado especificidad para una cepa de prion determinada, lo que limita mucho su uso como futura terapia [379-381]. A pesar de ello, varios estudios han descrito diversos compuestos capaces de unirse a las fibras amiloides de PrP^{Sc} evitando su disgregación. Debido a que los pequeños oligómeros tienen un papel importante durante la propagación [155], esta estrategia permitiría estabilizar las fibras o agregados amiloides con el objetivo de disminuir la cantidad de oligómeros, lo que provocaría una ralentización del proceso patológico. De esta forma se han identificado politiofenos conjugados luminiscentes (LCP, del inglés, *Luminiscent Conjugated Polythiophenes*), que son moléculas de pequeño tamaño que se unen a los agregados de PrP^{Sc}, que han mostrado eficacia *in vivo* [382]. En estudios anteriores, los LCP se describieron como compuestos capaces de detectar fibras amiloides y diferenciar cepas [383], lo que deriva en el problema al que se enfrentan las estrategias dirigidas contra la PrP^{Sc}: la especificidad de cepa y su limitación como futura terapia, ya que un LCP será más efectivo frente a unas cepas que frente a otras.

Para superar estas limitaciones, en los últimos años han sido identificados un gran número de compuestos que tienen como diana la PrP^C, ya que a pesar de ser un enfoque menos intuitivo, la PrP^C

constituye el sustrato universal para la replicación de cualquier cepa priónica de una especie dada. Además, su estructura tridimensional está bien definida, lo que favorece el diseño racional de moléculas con alto potencial terapéutico. Desde un punto de vista teórico, la unión a la PrP^C de pequeñas moléculas, conocidas como chaperonas moleculares, estabilizaría su conformación nativa, convirtiendo el proceso de malplegamiento en un proceso termodinámicamente desfavorable [384, 385]. El pequeño tamaño y la fácil manipulación de estas chaperonas moleculares o farmacológicas hacen que se puedan modificar fácilmente para aumentar su vida media, su unión a PrP^C o su paso a través de la barrera hematoencefálica. Además, al ser muy específicas no se necesitan altas dosis para obtener un efecto farmacológico eficaz. Varias chaperonas moleculares han sido descritas como inhibidoras de la propagación priónica, entre las cuales encontramos las porfirinas, las antraciclina, los pigmentos azoicos, las metilaminas, la heparina, el tegobuvir y el GN8 [385]. La más conocida y estudiada de todas ellas es la porfirina TMPyP-FeIII (del inglés, *Iron (III) meso-Tetra(N-methyl-4-pyridyl)porphine*), la cual es capaz de unirse a la PrP^C en ratio 1:1 con una Kd de 11 μM y ha demostrado su actividad en modelos celulares [301] y animales [386]. Todo ello indica que las aproximaciones terapéuticas dirigidas contra la PrP^C humana o que bloqueen la propagación de priones humanos constituye uno de los métodos con mayor potencial para la búsqueda de compuestos candidatos a convertirse en futura terapia contra las EET. Esto a su vez indica la necesidad de desarrollar sistemas *in vitro* e *in cellula* específicos para priones humanos que a su vez permitan el cribado masivo de compuestos específicos contra las EET humanas, lo que constituye el objetivo principal de esta tesis doctoral.

OBJETIVOS

- 1)** Desarrollo de un sistema *in vitro* para el cribado masivo de compuestos potencialmente anti-priónicos específicos contra las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles humanas
 - a)** Obtención de un prion recombinante humano *bona fide*
 - i) Optimización de los parámetros de la metodología de propagación de priones *in vitro* (PMSA) para el malplegamiento de PrP recombinantes humanas
 - ii) Generación de un panel de PrP recombinantes humanas malplegadas
 - iii) Caracterización de las propiedades bioquímicas y biológicas de las PrP recombinantes humanas malplegadas generadas previamente
 - b)** Adaptación del sistema de cribado masivo basado en PMSA a los priones recombinantes humanos
 - c)** Evaluación de la capacidad del sistema para el cribado de compuestos con actividad anti-priónica conocida.
 - d)** Prueba de concepto mediante el cribado de una biblioteca de compuestos tetrapirrólicos evaluados previamente en otra especie.

- 2)** Diseño de una estrategia alternativa basada en partículas esféricas para el cribado masivo de compuestos con potencial anti-priónico contra las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles humanas
 - a)** Evaluación de la capacidad del sistema para el cribado de compuestos

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Construcción de los plásmidos de expresión de las PrP de humano M129 y V129, humano M109I M129 y M109I V129, de topillo rojo y de oveja ARQ

1.1. Generación de plásmidos con PrP humana M129 y V129, topillo rojo I109 y oveja ARQ mediante recombinación homóloga

Para la producción de las PrP recombinantes de humano (con polimorfismos M129 y V129), topillo rojo y oveja ARQ (A136, R154 y Q171) en *Escherichia coli* (*E. coli*) utilizamos vectores plasmídicos especializados en la expresión de genes eucariotas. En concreto, utilizamos los vectores pOPIN desarrollados por *Oxford Protein Production Facility UK* (OPPF). Estos vectores están especialmente diseñados para su clonación mediante el sistema *In Fusion*, que permite una alta expresión de la proteína clonada [328]. Concretamente, utilizamos el plásmido pOPIN E, basado en el vector pTriEx2 cuyas principales características son su resistencia al antibiótico ampicilina, la presencia de un *enhancer* (del inglés, potenciador) híbrido de Citomegalovirus (CMV), del promotor de β -actina que permite la expresión de proteínas eucariotas en bacterias *E. coli* y de una diana para la carboxipeptidasa A seguida de una cola de 6 histidinas, necesarias para la purificación de proteínas mediante el sistema de cromatografía de afinidad Níquel - Ácido Nitriloacético (Ni-NTA, del inglés *Niquel - Nitriloacetic Acid*).

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

Para la clonación de las diferentes secuencias de PrP en el vector pOPIN E mediante el sistema *In Fusion*, los extremos de las secuencias de los ORF (del inglés, *Open Reading Frame*) de los genes de la PrP humana con los polimorfismos M129 y V129, de topillo rojo con el polimorfismo I109 y de oveja con los polimorfismos A136, R154 y Q171, extraídas previamente de tejido encefálico utilizando el kit de extracción de ADN genómico *NucleoSpin Tissue* (Macherey-Nagel) se amplificaron y adecuaron a la recombinación homóloga mediante la técnica de PCR, teniendo en cuenta las especificaciones señaladas en el protocolo de la OPPF. Este paso es crucial para la correcta clonación de las secuencias

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

- Oligonucleótido del extremo N-terminal para la PrP de humano M129 y V129:

AGGAGATATACCATGAAGAAGCGCCCGAAGCCTGG

- Oligonucleótido del extremo C-terminal para la PrP de humano M129 y V129:

GTGATGGTGATGTTAGCTGATCCTCTCTGGTAATA

- Oligonucleótido del extremo N-terminal para la PrP de topillo rojo I109:

AGGAGATATACCATGAAGAAGCGGCCAAAGCCTGG

- Oligonucleótido del extremo C-terminal para la PrP de topillo rojo I109:

GTGATGGTGATGTTAGGAACTTCTCCCTTCGTAGTA

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

AGGAGATATACCATGAAGAAGCGACCAAAGCCTGG

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

GTGATGGTGATGTTAACTTGCCCCCTTTGGTAATA

Utilizando como molde el DNA genómico de las especies indicadas anteriormente, se realizó una PCR con el fin de amplificar la secuencia de interés mediante los oligonucleótidos específicamente diseñados y mostrados en el párrafo anterior. Los reactivos presentes en las reacciones de PCR fueron: 2 – 10 ng de DNA genómico, 50 ng de cada uno de los oligonucleótidos (Sigma), 1.25 unidades LongAmp™ Taq DNA Polymerase (New England Biolabs), 10 µl 5X LongAmp™ Taq Reaction Buffer (New England Biolabs), 0.4 µl dNTP 10 mM (Sigma-Aldrich), H₂O desionizada (hasta alcanzar un volumen final de reacción de 50 µl, dependiendo de la concentración de DNA genómico). Las condiciones de PCR aplicadas fueron en primer lugar, un ciclo inicial de desnaturalización del molde de DNA de partida

mediante calentamiento a 95 °C durante 5 min, a continuación, 35 ciclos de amplificación y finalmente, un periodo adicional de 10 min a 72 °C que permite la extensión de los productos de PCR incompletos. Cada ciclo de amplificación consistió en un periodo de desnaturalización a 95 °C durante 20 s, seguido de un periodo de 45 s a 56 °C que facilita la hibridación de los oligonucleótidos con el molde de DNA, finalizando con un periodo de 60 s a 72 °C que permite la polimerización de las nuevas cadenas de DNA. El producto de PCR se almacenó y conservó a 4 °C. Para realizar las PCR se empleó el termociclador DNA Engine Peltier Thermal Cyclor, PTC-200 (Bio-Rad).

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

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

Finalmente, los vectores se transformaron en bacterias súper competentes *E. coli* DH5 XL-Gold® (Stratagene) siguiendo el protocolo estándar de transformación mediante choque térmico descrito por Inoue *et al* [387]. Todas las colonias bacterianas obtenidas se cultivaron en 2 ml de medio de cultivo Luria-Bertoni (LB) (Pronadisa) con 50 µg/ml de ampicilina (Sigma-Aldrich) y se incubaron a 37 °C en agitación toda la noche. Partiendo de estos cultivos, los plásmidos procedentes de colonias bacterianas se purificaron empleando el kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Para verificar que los plásmidos purificados tenían incorporados los genes que codifican las PrP humana M129, V129, topillo rojo I109 y de oveja ARQ se realizó un análisis de restricción de los plásmidos con la enzima de restricción Aval (New England Biolabs). Finalmente, con el fin de asegurar que los plásmidos obtenidos contenían las secuencias correctas, el gen de la PrP y los extremos adyacentes se secuenciaron completamente mediante el servicio de secuenciación de Stabvida empleando el oligonucleótido universal T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'). Así, se obtuvieron los siguientes plásmidos:

- pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ humana M129

- pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ humana V129
- pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ topillo rojo I109
- pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ oveja ARQ

1.2. Generación de plásmidos con PrP humana M109I V129 y M109I M129 mediante mutagénesis dirigida secuencial en dos pasos

Con el fin de introducir la mutación M109I, derivada del polimorfismo característico del topillo rojo que incrementa su tendencia al malplegamiento espontáneo frente al polimorfismo M109, se diseñó una pareja de oligonucleótidos que incorporaban el cambio correspondiente. El tamaño de los oligonucleótidos lo determinó el tipo de secuencia a los lados de la base a sustituir (aproximadamente 15 pares de bases hacia el extremo 3' y 15 pares de bases hacia el extremo 5'). Mediante este esquema de trabajo se 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). A continuación, se muestran los oligonucleótidos *forward* y *reverse* señalizando el nucleótido que se ha modificado (en negrita) en el codón (subrayado) que codifica el aminoácido sustituido:

HuM109I F: 5'- GCCAAAACCAACATTAAGCACATGGCTGG -3'

HuM109I R: 5'- CCAGCCATGTGCTTAATGTTGGTTTTGGC -3'

Partiendo de los plásmidos pOPIN E que expresan la PrP₂₃₋₂₃₁ humana, se efectuaron mutagénesis dirigidas secuenciales de dos pasos. Para ello, además de los oligonucleótidos específicos diseñados para introducir la mutación, se diseñaron dos oligonucleótidos que hibridan con una secuencia del vector pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ de humano próxima al gen que codifica la PrP, un oligonucleótido *forward* cerca del extremo 3' y un oligonucleótido *reverse* cerca del extremo 5' del ORF de la PrP humana:

- Oligonucleótido *forward* extremo 3': 5'-CTGGCGTGTGACCGCGGC-3'
- Oligonucleótido *reverse* extremo 5': 5'-CCCTCCCATATGCCTTCC-3'

En un primer paso se realizaron dos PCR, una de ellas con el oligonucleótido *forward* que contenía la mutación a introducir y el oligonucleótido *reverse* del extremo 5'; y la otra con el oligonucleótido *forward* del extremo 3' y el oligonucleótido *reverse* que contiene la mutación. En todos los casos y en esta primera fase, las PCR empleadas contenían: 2 ng de plásmido de pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ 129M o 129V

de humano, 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 (20 mM MgSO₄), 0.4 µl de dNTP 10 mM y H₂O (hasta 50 µl).

Las condiciones de PCR aplicadas fueron en primer lugar, un ciclo inicial de desnaturalización del molde de DNA de partida mediante calentamiento a 95 °C durante 5 min, a continuación, 40 ciclos de amplificación y finalmente, un periodo adicional de 10 min a 72 °C que permite la extensión de los productos de PCR incompletos. Cada ciclo de amplificación consistió en un periodo de desnaturalización de 95 °C durante 20 s, seguido de un periodo de 45 s a 56 °C que facilita la hibridación de los oligonucleótidos con el molde de DNA y finaliza con un periodo de 60 s a 72 °C que permite la polimerización de las nuevas cadenas de DNA. Los productos de PCR fueron almacenados y conservados a 4 °C.

Como resultado de esta primera fase se obtuvieron dos fragmentos de DNA, que contenían cada uno de ellos un fragmento del gen que codifica la PrP humana con la mutación M109I. La purificación de estos 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 humana 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 N-terminal y *reverse* que hibrida cerca del extremo C-terminal del gen que codifica la PrP. En todos los casos y en esta última fase, las PCR empleadas contenían: 50-100 ng de fragmentos de DNA 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 y H₂O (hasta 50 µl). Las condiciones de PCR aplicadas fueron idénticas a las empleadas en el primer paso. Los fragmentos amplificados se purificaron con *GeneJet PCR Purification Kit* (Fermentas) siguiendo el protocolo del fabricante.

Con el fin de clonar los distintos fragmentos de DNA codificantes generados en el apartado anterior en el vector de expresión pOPIN E, se llevaron a cabo las siguientes digestiones con enzimas de restricción y purificaciones. En primer lugar, los fragmentos de DNA que codifican la PrP₂₃₋₂₃₁ humana se digirieron con la enzima de restricción XmaI (Fermentas) y posteriormente, tras realizar una purificación con *GeneJet PCR Purification Kit* (Fermentas), se digirieron con la enzima de restricción StuI (Fermentas), en todos los casos, siguiendo las especificaciones del fabricante. La enzima de restricción XmaI reconoce una secuencia de DNA ubicada cerca del extremo N-terminal de la secuencia del gen que codifica la PrP₂₃₋₂₃₁ humana, mientras que StuI digiere en una zona cercana al extremo C-

terminal, dando lugar a un fragmento de 556 pb. Para la elección de las enzimas de restricción mencionadas se utilizó el software libre “NEBcutter V2.0” (New England Biolabs). Los fragmentos digeridos se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v), tinción con *RedSafe* 0.1 % (v/v) (Proquinorte) y *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen), siguiendo el protocolo del fabricante. Puesto que el sitio de restricción de XmaI estaba impedido por la metilación CpG de las citosinas, los plásmidos pOPIN E que contienen el gen que codifica la PrP₂₃₋₂₃₁ humana con el polimorfismo M129 o V129 fueron transformados en bacterias competentes *E. coli* HST08 *Stellar*TM (*dam-/dcm-*) (Clontech). Las transformaciones se realizaron siguiendo el protocolo estándar de transformación por choque térmico [387]. Los plásmidos procedentes de todas las colonias bacterianas obtenidas se purificaron empleando el *GeneJET*TM *Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Para verificar que los plásmidos purificados tuvieran el plásmido adecuado se efectuó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % y tinción con *RedSafe* 0.1 %. Los plásmidos pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ humana que contienen cada uno de los polimorfismos en la posición 129 y purificados a partir de bacterias sin capacidad de metilar, fueron digeridos con las enzimas de restricción XmaI y StuI, siguiendo el procedimiento mencionado anteriormente. Los fragmentos de 5222 pb fueron purificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, tinción con *RedSafe* 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 PrP₂₃₋₂₃₁ humanas M109I fueron clonados en los vectores pOPIN E obtenidos. 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*TM *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'). Así se obtuvieron los plásmidos:

- pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ humana M109I M129
- pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ humana M109I V129

2. Obtención de proteínas recombinantes

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

Para producir las proteínas recombinantes humanas, tanto WT como con la mutación M109I, de topillo rojo y de oveja ARQ a partir de los plásmidos pOPIN E generados anteriormente, se transformaron en bacterias súper competentes *E. coli Rossetta (DE3)*TM (EMD Millipore), desarrolladas especialmente para la expresión de proteínas eucariotas. Los plásmidos pOPIN E se transformaron específicamente en estas bacterias mediante el protocolo estándar de transformación por choque térmico [387]. Posteriormente se conservaron a -80 °C en medio LB + glicerol en proporción 1:1 (v:v).

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

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

El precipitado bacteriano resultante se resuspendió en 100 ml de solución de lisis [50 mM tris(hidroximetil)aminometano hidrocloreto Tris-HCl (Fisher Bioreagents), 5 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Sigma-Aldrich), 1 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich), 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma-Aldrich), 100 µg/ml Lisozima (Sigma-Aldrich), ajustado a pH 8.0] y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente en presencia de 100 U/ml de desoxirribonucleasa (DNAsa) (Sigma-Aldrich) con agitación suave y cloruro de magnesio (MgCl₂) (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 20 mM, necesario para el correcto funcionamiento de la DNAsa. El producto lisado se centrifugó a 8500 g (Centrífuga Sorvall ST 16R, Thermo Scientific) durante 1 h y a una temperatura de 4 °C. El precipitado resultante se resuspendió en 100 ml de solución de lavado [20 mM

Tris-HCl (Fisher Bioreagents), 150 mM cloruro de sodio (NaCl) (Sigma-Aldrich), 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich), 1 % Sarkosyl (Sigma-Aldrich), ajustado a pH 8.0]. El material resuspendido se centrifugó de nuevo a 8500 g durante 1 h a una temperatura de 4 °C y el precipitado resultante se disgregó en 12 ml de solución de inclusión [20 mM Tris-HCl (Fisher Bioreagents), 0.5 M NaCl (Sigma-Aldrich), 6 M hidrocloreuro de guanidinio (Gdn-HCl) (Fisher Scientific), ajustado a pH 8.0]. Con el objetivo de disolver totalmente los cuerpos de inclusión presentes en el precipitado, el material resuspendido se incubó a 37 °C durante toda la noche con agitación suave. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 8500 g durante 1 h a una temperatura de 4 °C. El sobrenadante resultante se filtra utilizando un tamaño de poro de 0.22 µm (Minisart, Sartorius Stedim).

Una vez filtrada, la PrP recombinante presente en la muestra se purifica utilizando columnas de afinidad de histidinas *HisTrap FF Crude 5 ml* (GE Healthcare Amersham) acopladas a un sistema de FPLC (ÄKTA™ start, GE Healthcare Amersham). Las columnas se equilibran con 35 ml de solución de unión [20 mM Tris-HCl (Fisher Bioreagents), 500 mM NaCl (Sigma-Aldrich), 5 mM Imidazol (Sigma-Aldrich), 2 M GndCl (Fisher Scientific), ajustado a pH 8.0]. Seguidamente, la muestra se carga en la columna, se lava con 75 ml de solución de unión y finalmente la PrP se eluye utilizando 30 ml de solución de elución [20 mM Tris-HCl (Fisher Bioreagents), 500 mM NaCl (Sigma-Aldrich), 500 mM Imidazol (Sigma-Aldrich), 2 M GndCl (Fisher Scientific), ajustado a pH 8.0]. Las proteínas purificadas se desnaturalizaron completamente aumentando la concentración de Gdn-HCl hasta 6 M y posteriormente se concentraron hasta alcanzar 1000 µM o 25 mg/ml mediante filtros de centrifugación con un límite de exclusión de 10 kDa *Amicon Ultra-15 10KDa Centrifugal filter unit* (Millipore). Finalmente, las proteínas recombinantes generadas se almacenan a -80 °C hasta su uso.

La pureza de las proteínas recombinantes obtenidas y la eficacia del proceso de purificación se evaluaron mediante tinción de proteína total tras electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) en geles *Criterion TGX 4 – 15 %* (Bio-Rad). A lo largo del proceso de purificación se fueron recogiendo muestras de 10 µl de varios de los eluidos obtenidos. En concreto se recogieron muestras de 10 µl de la muestra filtrada antes de cargarla en la columna de afinidad, de la muestra filtrada tras su paso por la columna y de la proteína final purificada. A continuación, las muestras de 10 µl se precipitaron añadiendo 56,7 µl de metanol frío (Fisher Chemical) y tras centrifugar durante 30 min a una velocidad de 19000 g y a 4 °C de temperatura (Centrífuga Sorvall ST 16R, Thermo Scientific), el material precipitado se resuspendió en 16 µl de solución de carga *NuPAGE* (Invitrogen Life Technologies) diluido 1:3 en PBS (del inglés *Phosphate Buffer Saline*) (Fisher Bioreagents) y se cargó en el gel de electroforesis. Por último, el gel se incubó durante 1 h a temperatura ambiente en solución de tinción *BlueSafe* (Nzytech).

3. PMSA como método de generación y propagación de proteínas malplegadas *in vitro*

En este apartado se explicará la preparación de los sustratos para PMSA utilizando las PrP recombinantes de humano M129 y V129, humano M109I M129 y M109I V129 y topillo rojo I109 complementada con dextrano sulfatado y se indicarán en detalle los diferentes métodos de generación y propagación de proteínas malplegadas mediante PMSA utilizados en esta tesis doctoral.

3.1. Preparación de sustratos para PMSA

A lo largo del proceso de preparación, todos los componentes que forman parte de los sustratos se mantuvieron a 4 °C para preservar su estabilidad. Tras su preparación, se alicuotaron convenientemente y se conservaron a 4 °C durante un máximo de 24 h protegidos de la luz (aquellos sustratos que serán utilizados para la generación espontánea de rec-PrP^{res} humana tras la adaptación para el trabajo específico con PrP humana) o -80 °C hasta la realización de los experimentos (aquellos sustratos que serán utilizados para la propagación o escalado de semillas priónicas).

Las proteínas purificadas mediante columnas de afinidad HisTrap se diluyeron en ratio 1:5 en PBS (Fisher BioReagents), se cargaron en casetes de diálisis con un límite de exclusión de 10 kDa *Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette 10K MWCO* (Thermo Scientific) y se dializaron durante 1 h frente a PBS a temperatura ambiente. Durante el proceso de diálisis se puede observar la formación de acúmulos blanquecinos de proteína anormalmente plegada. Para la eliminación de este precipitado las muestras dializadas se centrifugaron a 19 000 g durante 15 min a una temperatura de 4 °C (Centrífuga Sorvall ST 16R, Thermo Scientific). Finalmente se recogió el sobrenadante que contiene la proteína PrP soluble plegada. La concentración de esta se midió utilizando el kit *BCA Protein Assay* (Fisher Scientific) siguiendo el protocolo del fabricante para monitorizar cualquier problema durante la diálisis. Todas las mediciones de proteína dializada se han realizado de la misma manera, utilizando el kit *BCA protein Assay* y siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez preparada la proteína, esta se diluyó en solución de conversión fría [PBS (Fisher BioReagents), 150 mM NaCl (Sigma-Aldrich), 1 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich)] en ratio 1:10. De esta forma la concentración final de proteína es de aproximadamente 2 – 3 µM o 50 – 70 µg/ml. Por último, se añadió dextrano sulfatado hasta alcanzar una concentración final de 0.5 % (p/v).

En aquellos casos en que se ha tratado de aumentar la concentración de proteína en el sustrato, se han evitado las manipulaciones de la misma post-diálisis, ya que la concentración a través de filtros de centrifugación ocasionaba grandes pérdidas de proteína por la formación de agregados amorfos, debido a la inestabilidad de la forma nativa de las PrP humanas en soluciones con concentraciones

superiores a 3 μ M. Por tanto, para el apartado de Resultados en el que se trata de introducir mejoras en el sustrato se llevan a cabo las siguientes modificaciones en el proceso descrito:

Concentración de proteína pre-diálisis: Con el objetivo de obtener mayor cantidad de proteína soluble en el sustrato final, se concentró la proteína a 1000 μ M conservada en 6 M de GdnCl, 2X y 4X, utilizando el doble y cuádruple del volumen habitual respectivamente, mediante filtros de centrifugación con un límite de exclusión de 10 kDa *Amicon Ultra-15 10KDa Centrifugal filter unit* (Millipore). Tras llevarlos a un volumen equivalente al habitual (1X), se sometieron a dilución 1:5 (v/v) en PBS y diálisis como se ha explicado previamente. Tras centrifugar de la misma manera para eliminar la proteína precipitada, se monitorizó la concentración de proteína soluble mediante *BCA Protein Assay* siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. La concentración de cada muestra se midió por triplicado.

Diálisis en soluciones tamponadoras alternativas: Otra de las opciones para tratar de reducir la precipitación observada con las PrP recombinantes humanas durante la diálisis, consistió en utilizar soluciones alternativas al PBS utilizado habitualmente basándose en la bibliografía existente al respecto. Para ello, se probaron soluciones tamponadoras compuestas por 0.5 M Gdn-HCl en PBS (Fisher BioReagents) [388] o por 20 mM acetato sódico (AcNa) ajustada a pH 5.0 [389] o 10 % de glicerol (v/v) en PBS (Fisher BioReagents) [390]. Previamente, las PrP humanas se diluyeron en ratio 1:5 (v/v) en PBS (Fisher BioReagents) y seguidamente se procedió a dializar 1 h como se ha descrito anteriormente pero utilizando las diferentes soluciones tamponadoras alternativas. Tras la diálisis se centrifugaron las muestras a 19 000 g durante 15 min a una temperatura de 4 °C (Centrífuga Sorvall ST 16R, Thermo Scientific). Para la preparación final del sustrato de PMSA, tras medir la concentración de PrP en la muestra tras la centrifugación mediante *BCA Protein Assay* siguiendo el protocolo indicado por el fabricante, la proteína soluble se diluyó en solución de conversión fría en ratio 1:10 y se añadió dextrano sulfatado hasta alcanzar una concentración final de 0.5 % (p/v).

Congelación y descongelación de proteína dializada: Para testar el efecto de los ciclos de congelación y descongelación sobre la concentración de PrP, las muestras post-diálisis obtenidas mediante el protocolo estándar se sometieron a 5 ciclos de congelación/descongelación. Para ello, tras aplicar el protocolo de diálisis estándar descrito anteriormente, las muestras se centrifugaron de igual forma a 19 000 g durante 15 min a 4 °C (Centrífuga Sorvall ST 16R, Thermo Scientific). El sobrenadante se colocó en un tubo tipo eppendorf de 1.5 ml limpio (Eppendorf™) y se midió la concentración de PrP de cada muestra mediante *BCA Protein Assay* siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Una vez preparadas las muestras y medida la concentración inicial de cada una de ellas, se congelaron y descongelaron 5 veces. Para congelar las muestras se colocaron a -80 °C durante 20 min y pasado este tiempo, cada muestra se descongeló a temperatura ambiente. Una vez descongeladas completamente

se centrifugó de nuevo a 19 000 *g* durante 15 min a una temperatura de 4 °C para eliminar los posibles agregados amorfos que se han formado por la congelación/descongelación. Antes de congelar de nuevo cada muestra para realizar otro ciclo de congelación/descongelación, se tomó una alícuota de 30 µl de cada una de ellas para medir por duplicado la concentración de PrP mediante *BCA Protein Assay* siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Este proceso se repitió un total de 5 veces.

3.2. Ensayo para determinar la adsorción de las PrP recombinantes a superficies de vidrio

Con el objetivo de determinar el grado de adsorción de las PrP recombinantes humanas M129 y V129 y de topillo rojo I109 en función de los mm² de superficie de vidrio y tiempo, las PrP recombinantes se dializaron y centrifugaron tal y como se ha descrito y posteriormente se incubaron en presencia de diferentes cantidades de partículas esféricas de vidrio de 0.1 mm de diámetro (BioSpec Products). De esta forma, 500 µl de cada PrP recombinante se incubaron en presencia de 0, 2.1, 5.0, 12.5, 37.5, 133.4 y 258.5 mg de partículas esféricas, que se corresponden con 0, 50, 120, 300, 900, 3200 y 6200 mm² de superficie de vidrio, respectivamente. Para calcular la relación entre peso y superficie de vidrio de las partículas esféricas de 0.1 mm se tuvo en cuenta la densidad del vidrio (2.5 mg/mm³) y la superficie y volumen de una esfera. Para pesar cada cantidad de partículas esféricas se utilizaron tubos de tipo eppendorf de 2.0 ml con fondo cónico (Thermo Scientific) y una balanza de precisión Summit SI234.3 (Denver Instrument). Una vez preparados los tubos con las partículas esféricas de 0.1 mm se añadió cada PrP recombinante y se procedió a su incubación a temperatura ambiente y en movimiento gracias a la utilización de un mini agitador-mezclador compacto (Revolver, Biogen Científica). Se tomaron 30 µl de muestra de cada PrP recombinante y superficie de vidrio a los 0, 30, 60 y 90 min y se determinó la concentración de PrP de cada muestra por duplicado mediante *BCA protein Assay* siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.3. PMSA para propagación de PrP malplegada *in vitro*

Para la obtención y posterior propagación o escalado de PrP recombinante malplegada mediante PMSA, se ha seguido el siguiente procedimiento. El sustrato de PMSA preparado tanto con PrP recombinantes humanas como con PrP recombinante del topillo rojo, se alicuotaron entre 500 y 800 µl en tubos tipo eppendorf de 2 ml con fondo cónico (Thermo Scientific) previamente rellenos con aproximadamente 250 mg de partículas esféricas de zirconio – sílice de 1 mm de diámetro (BioSpec Products) Estos se inocularon a la dilución indicada en cada apartado (entre 1:10¹ y 1:10⁸, inóculo:sustrato), tanto para inóculos provenientes de homogenizados de encéfalo al 10 % como para semillas recombinantes originadas previamente en PMSA. Estos tubos con sustrato y semilla se

sometieron a PMSA de 24 h (es la duración estándar de una ronda de PMSA a no ser que se indique lo contrario) utilizando termobloques con agitación (*Digital Shaking Drybath*, Thermo Scientific) a 39 °C y 700 o 1000 rpm de agitación continua (la velocidad de agitación utilizada se indica en cada caso en el apartado de Resultados). De forma habitual se realizan PMSA de 24 h pero que pueden acortarse hasta 6 h dependiendo de si se quiere obtener el máximo posible de proteína malplegada o únicamente determinar la capacidad de propagación de una determinada semilla.

En el caso en el que se utilizan como semilla homogenizados de encéfalo concentrados y parcialmente purificados mediante colchón de sacarosa, se procedió de la siguiente manera para la preparación de las semillas: se preparó 500 µl de sacarosa (Sigma-Aldrich) al 30 % (p/v) en PBS (Fisher Bioreagents) en tubos de tipo eppendorf de 1.5 ml por cada muestra a utilizar como semilla. A continuación, 50 µl de cada muestra se diluyó 1:10 en solución de conversión fría y se depositó suavemente sobre el colchón de sacarosa al 30 %. Seguidamente, se centrifugaron las muestras a 19 000 g durante 1 h a una temperatura de 4 °C (Centrífuga Sorvall ST 16R, Thermo Scientific) y tras la centrifugación se retiró el sobrenadante y se conservó el precipitado o *pellet*. A este material precipitado, que contiene las fibras de PrP malplegada de la semilla, se añadió 1 ml de PBS (Fisher Bioreagents) para eliminar los restos del colchón de sacarosa. A continuación, se volvió a centrifugar a 19 000 g durante 15 min a 4 °C y tras ello se descartó el sobrenadante. El material precipitado se resuspendió en 200 µl de solución de conversión fría, obteniéndose así semillas preparadas para su utilización en PMSA.

3.4. PMSA para la generación de PrP malplegada *in vitro* de forma espontánea

Se realiza de forma similar a la propagación de proteínas malplegadas por PMSA. En este caso, en las condiciones previas a la adaptación específica al trabajo con PrP recombinantes humanas, se utilizaron tubos de tipo eppendorf de 2 ml con fondo cónico (Thermo Scientific), previamente rellenos con aproximadamente 200 mg de partículas esféricas de vidrio de 0.1 – 0.2 mm de diámetro, a los que se añadían 800 µl de sustrato de PMSA. Para pesar las partículas esféricas se utilizó una balanza de precisión Summit SI234.3 (Denver Instrument). Estos tubos se sometieron a PMSA en termobloques con agitación como los utilizados previamente durante 24 h a 39 °C y 1000 rpm de agitación continua.

Ante la ausencia de PrP recombinantes humanas WT malplegadas de forma espontánea y la baja eficiencia de malplegamiento de las PrP recombinantes humanas con mutación M109I frente a las de roedores que presentan esta misma mutación en las condiciones anteriores, se estudió la influencia de parámetros como la concentración de PrP recombinante soluble en el sustrato (detallado en el apartado previo), cantidad y tamaño de las partículas esféricas y la velocidad de agitación (de 500, 700

y 1000 rpm). Los resultados obtenidos llevaron a utilizar las siguientes condiciones para la generación de PrP recombinante humana malplegada de forma espontánea: utilizando 500 – 800 µl de sustrato conservado a 4 °C y protegido de la luz, en tubos de tipo eppendorf de 2ml con fondo cónico con 200 mg de partículas esféricas de vidrio de 1.0 mm y agitación continua a 700 rpm durante 24 h. Es importante señalar que debido a la irregularidad en el tamaño de las partículas esféricas de vidrio de 1.0 mm observada se determinó empíricamente que el diámetro medio de estas partículas es de 1.2 mm, dato necesario, junto con la densidad del vidrio (2.5 mg/mm³) y el volumen y superficie de una esfera, para el cálculo de la cantidad de partículas esféricas que se corresponden con una determinada superficie de vidrio. Así, 200 mg de partículas esféricas de este tipo se corresponden aproximadamente con 400 mm² de superficie de vidrio. Para pesar la cantidad necesaria de partículas esféricas se utilizó una balanza de precisión Summit SI234.3 (Denver Instrument).

4. Generación espontánea de fibras amiloides en presencia de hidrocloreto de guanidinio

Basado en las publicaciones de Breydo *et al.* y Torrent *et al.* [389, 391], se diseñó un protocolo para la generación *in vitro* de amiloides en presencia de hidrocloreto de guanidinio (denominadas de ahora en adelante fibras Gdn), que presentan características como la capacidad de auto-replicación y en ocasiones cierto grado de resistencia a proteasas, pero que no presentan infectividad *in vivo*, o requieren de múltiples inoculaciones seriadas para causar una patología priónica, con el objetivo de demostrar que las PrP recombinantes malplegadas humanas obtenidas espontáneamente mediante PMSA eran claramente distinguibles de este tipo de amiloides. Para ello, 2 ml de las PrP recombinantes humanas M129 y V129 preparadas previamente se diluyeron 1:5 añadiéndole 8 ml de solución tamponadora fosfato 50 mM ajustada a pH 6.0 [preparada con Na₂HPO₄ (Supelco, VWR International Eurolab) a 6.8 mM y NaH₂PO₄ (Supelco, VWR International Eurolab) a 43.2 mM] y se dializaron frente a 5 L de la misma solución tamponadora durante 1 h y frente a otros 5 L de otra solución igual durante 1 h adicional, utilizando una membrana de diálisis (*SnakeSkin Dialysis Tubing*, Thermo Scientific). Tras dializar las proteínas se centrifugaron durante 15 min a 19 000 g a 4 °C, se midió la absorbancia a 280 nm del sobrenadante (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) utilizando el coeficiente de extinción molar y el peso molecular de cada una (57995 M⁻¹ cm⁻¹ y 22.965 kDa para la PrP human M129, y 57995 M⁻¹ cm⁻¹ y 22.965 kDa para la 129V) para determinar su concentración y se ajustó a 1 mg/ml utilizando filtros de centrifugación con un límite de exclusión de 10 kDa *Amicon Ultra-15 10KDa Centrifugal filter unit* (Millipore), reduciendo el volumen aproximadamente hasta 5 ml. Estos 5 ml de cada proteína a 1 mg/ml se mezclaron con 5 ml de una solución compuesta por H₂O milliQ (Millipore), solución tamponadora fosfato a 500 mM pH 6.0 para una concentración final de 50 mM y Gdn-HCl a 6 M para

una concentración final de 2 M, obteniendo 10 ml de solución a una concentración final de PrP recombinante de 0.5 mg/ml. La solución se incubó en un tubo falcon de 15 ml (Fisherbrand), sellado con film plástico (Parafilm) a 39 °C y a 30 rpm aproximadamente en un agitador *Monoshake* (Thermo Scientific) durante 30 días. El producto obtenido tras los 30 días en agitación se dializó frente a PBS (Fisher Bioreagents) durante 3 h, realizando un cambio de solución de diálisis cada hora. El material dializado se alicuotó y se conservó a -80 °C hasta su utilización.

5. Generación espontánea de agregados amorfos de PrP mediante agitación

Con el objetivo de diferenciar las PrP recombinantes humanas malplegadas espontáneamente de los posibles materiales agregados de forma inespecífica que se puedan generar durante el proceso de agitación del sustrato recombinante humano, a los que denominaremos agregados amorfos, y que no presentan resistencia a PK o su resistencia es muy baja y no tienen la capacidad de auto-replicación [330], se llevó a cabo la obtención de dicho material amorfo con las PrP recombinantes humanas M129 y V129. Para ello, se añadió 800 µl de sustrato de PMSA elaborado para cada tipo de PrP humana y en este caso no se añadió ninguna partícula esférica, ya que estas promueven el malplegamiento espontáneo a rec-PrP^{res} de la PrP humana. Estos tubos con solo sustrato se sometieron a agitación en los mismos termobloques con agitación usados para la PMSA durante 7 días a 39 °C y 1000 rpm de agitación continua. El material amorfo obtenido tras este proceso se conservó a -80 °C hasta su utilización.

6. Propagación de PrP malplegada mediante PMCA

6.1. Preparación de sustratos para PMCA basada en PrP recombinante complementada con encéfalos de ratón KO-PrP

Al igual que en la preparación de los sustratos par PMSA, todo el proceso de elaboración de los sustratos para PMCA se llevó a cabo manteniendo todos los componentes a 4 °C para favorecer su estabilidad. Tras su preparación, se alicuotaron convenientemente y se conservaron a -80 °C hasta la realización de los experimentos.

Las PrP recombinantes de humano M129, oveja ARQ y topillo rojo I109 se diluyeron 1:5 en PBS (Fisher Bioreagents) y se dializaron frente a PBS durante 1 h a temperatura ambiente empleando casetes de diálisis con un límite de exclusión de 10 kDa *Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette 10K MWCO* (Thermo Scientific). Tras la diálisis, las muestras se centrifugaron a 19 000 g durante 15 min a una temperatura de 4 °C (Centrífuga Sorvall ST 16R, Themo Scientific), con el fin de eliminar la proteína recombinante anormalmente plegada como consecuencia del proceso de diálisis, y se recogió el

sobrenadante que contenía la proteína soluble. Con el objetivo de complementar los sustratos con factores que fomentan la propagación de priones y testar los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85 con PrP recombinante, pero en un modelo más parecido a una situación *in vivo* se emplearon encéfalos de ratones KO-PrP, los cuales no expresan la PrP^C [356]. Para ello, los encéfalos de dichos ratones se extrajeron tras sacrificar los animales mediante inhalación de dióxido de carbono (CO₂) y fueron perfundidos mediante punción cardiaca con 50 ml de solución de perfusión [PBS (HyClone sin iones de Ca y Mg) y 5 ml de EDTA (Sigma-Aldrich)] con el objetivo de eliminar la mayor cantidad de sangre de sangre posible. Con la ayuda de un homogeneizador de tipo Potter-Elvehjem (Fisherbrand) los encéfalos perfundidos se homogeneizaron al 10 % (p/v) en solución de conversión fría a la que se le había añadido previamente un inhibidor de proteasas (*CompleteTM Cocktail 1X*, Roche). Todo el proceso se llevó a cabo en hielo para evitar el calentamiento de las muestras debido a la fricción asociada al proceso de homogeneización. Con el fin de eliminar restos de tejidos no homogeneizados correctamente la muestra se centrifugó a 19 000 *g* durante 15 min a 4 °C (Centrífuga Sorvall ST 16R, Thermo Scientific) y el precipitado se descartó. Finalmente, la PrP recombinante dializada y centrifugada anteriormente se mezcló para su complementación con el homogeneizado de encéfalo KO-PrP a 1:10 (PrP recombinante:encéfalo). El sustrato generado se alicuotó convenientemente y se conservó a -80 °C hasta su posterior uso.

6.2. Preparación de sustratos para PMCA basada en homogeneizados de encéfalos de ratón

De igual forma, con el objetivo de evaluar la capacidad de inhibición de los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85 en un modelo más cercano a una situación *in vivo*, se utilizaron homogeneizados de encéfalos de ratones transgénicos como sustrato en lugar de PrP recombinante complementada con homogeneizado de encéfalos KO-PrP. Los ratones transgénicos que se utilizaron fueron los ratones Tg338, que sobre-expresan (8X) la PrP^C ovina VRQ (V136, R154 y Q171) [392], los ratones transgénicos TgVole, que expresan la PrP^C de topillo rojo con el polimorfismo I109 y los ratones transgénicos TgWV, que expresan (1X) la PrP^C humana V129 [393]. Los animales se sacrificaron mediante inhalación de CO₂ y fueron perfundidos mediante punción cardiaca como se describe en el apartado anterior. Los encéfalos se homogeneizaron al 10 % (p/v) en solución de conversión fría a la que se le añadió previamente el inhibidor de proteasas (*CompleteTM Cocktail 1X*, Roche). El proceso de homogeneización se realizó de igual forma que con los encéfalos de ratones KO-PrP. Por último, los homogeneizados que serán utilizados como sustratos para PMCA se alicuotaron convenientemente y se conservaron a -80 °C hasta su uso.

6.3. Propagación de priones recombinantes y procedentes de encéfalo mediante PMCA en presencia de compuestos inhibidores

La propagación *in vitro* de priones mediante PMCA se realizó basándonos en el procedimiento descrito por Castilla y colaboradores [93, 305, 310] que permite mimetizar *in vitro* el proceso de propagación priónica que tiene lugar *in vivo*, pero con una cinética acelerada.

Tanto para la propagación de priones recombinantes como para la propagación de priones de encéfalos se utilizaron tubos de 0.2 ml de pared fina (Axygen) para favorecer la penetración de las ondas ultrasónicas. El volumen de sustrato empleado para ambos formatos de PMCA fue de 50 μ l y se utilizaron partículas esféricas de zirconio – sílice de 1.0 mm de diámetro para aumentar la homogeneidad de los resultados [268]. Se utilizó un sonicador Misonix Q-700 con sistema de microplaca (Qsonica) programado para llevar a cabo ciclos de 30 min de incubación y 15 – 20 s de sonicación a una amplitud del 60 – 80 %. La temperatura a lo largo de todo el proceso se mantuvo constante a 37 – 39 °C utilizando un baño de agua circulante (Thermo Scientific).

Tanto para evaluar la capacidad anti-priónica de compuestos mediante PMCA como PMSA, se llevaron a cabo diluciones seriadas de las semillas. Sin embargo, y basándonos en la experiencia previa del laboratorio, no nos limitamos a las diluciones 1:10¹ – 1:10⁸, sino que estas se adecuaron a la capacidad propagativa de las diferentes semillas de priones utilizadas y del tipo de PrP recombinante o PrP^C presentes en el sustrato. Una vez realizadas las diluciones seriadas de cada semilla en el sustrato de PMCA correspondiente se añadieron los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85 a una concentración final de 500 μ M. Como control positivo de propagación se utilizaron las mismas diluciones seriadas con vehículo DMSO y como control positivo de inhibición se procedió de igual forma, pero añadiendo TMPyP-FeIII a 500 μ M. Finalmente, las diluciones seriadas se sometieron a una ronda de PMCA de 24 o 48 h utilizando las condiciones descritas anteriormente.

La evaluación de la capacidad inhibitoria de los compuestos se llevó a cabo mediante PMCA basada en dos tipos de sustratos diferentes y los parámetros empleados durante la sonicación fueron específicos en función del tipo de sustrato que se empleó para la propagación de priones *in vitro*. A continuación, se describen los parámetros y semillas priónicas utilizadas en función del formato de PMCA empleada:

PMCA basada en PrP recombinante complementada con encéfalos de ratón KO-PrP: para testar la capacidad de inhibir la propagación priónica de los compuestos mediante este formato se utilizaron los sustratos recombinantes de PMCA descritos anteriormente y semillas recombinantes de las mismas especies que las PrP de dichos sustratos. En el caso de topillo rojo, la semilla recombinante proviene de un experimento de espontaneidad en PMCA utilizando el mismo tipo de sustrato recombinante (H-

seeded-02, [258]). Todas las diluciones preparadas con esta semilla se sometieron a una ronda de PMCA de 24 h de duración. Por su parte, la semilla recombinante de oveja proviene de la adaptación a la PMCA recombinante de un aislado de scrapie conocido como Dawson (OvDawson rec-PrP^{res}, [394]). La PMCA con esta semilla recombinante de oveja también tuvo una duración de 48 h. Por último, la semilla recombinante humana utilizada deriva de la adaptación de PMCA recombinante de un homogeneizado de encéfalo humano con sCJD MM1 (obtenida previamente en nuestro laboratorio, no publicado) y la duración de la ronda de PMCA para esta semilla fue de 24 h. La PMCA se basó en tiempos de incubación de 30 min y pulsos de sonicación de 15 s, a una potencia del 60 % y una temperatura media de 39 °C.

PMCA basada en homogeneizados de encéfalos de ratones transgénicos: para evaluar los inhibidores en un modelo más cercano a la realidad se utilizaron los sustratos preparados con diferentes homogeneizados de encéfalos de ratones transgénicos. Las semillas priónicas de cada especie para estos experimentos de PMCA derivan de encéfalos de animales afectados y son las siguientes: la semilla encefálica de topillo rojo procede de un homogeneizado de encéfalo de TgVole inoculado con el prion recombinante L-seeded-PMSA(1) (TgVole^{L-seeded-PMSA(1)}, [330]) las diluciones seriadas realizadas con ella se sometieron a una ronda de PMCA de 48 h. La semilla encefálica humana utilizada proviene de la adaptación de un homogeneizado de encéfalo humano con sCJD VV2 (cedido por el Dr. W. Zhou, Case Western University) a la PMCA utilizando sustrato basado en PrP^C del modelo transgénico TgWV. Las diluciones seriadas con esta semilla se sometieron a PMCA de 24 h. Por último, la semilla de encéfalo de oveja utilizada procede de la adaptación de un aislado de scrapie de tipo Dawson a PMCA con sustrato basado en PrP^C de ratones transgénicos Tg338 (Dawson^{PMCA}, [395]) y las diluciones llevadas a cabo con esta semilla se sometieron a una ronda de PMCA de 48 h de duración. El tiempo del ciclo de incubación de la PMCA fue de 30 min, seguidos de pulsos de sonicación de 20 s, a una potencia del 80 % y una temperatura media de 37 °C.

6.4. Propagación de PrP malplegadas obtenidas por PMSA en PMCA basadas en homogeneizados de encéfalos para la determinación de la infectividad *in vivo* potencial

Metodológicamente, la evaluación de la capacidad de infección potencial de las rec-PrP humanas malplegadas espontáneamente en PMSA mediante PMCA es similar a la propagación de priones recombinantes o de origen encefálico mediante diluciones seriadas descritas anteriormente. Para ello, se llevaron a cabo rondas seriadas de PMCA en las que las PrP malplegadas recombinantes en estudio se diluyeron 1:10 en el sustrato de interés. En nuestro caso, los sustratos utilizados se basaron en homogeneizados de encéfalos de ratones TgNN6h [396], que expresan (0.6X) la PrP^C humana carente

de N-glicosilaciones debido a mutaciones puntuales de los sitios de unión de los glicanos (N181Q y N197Q), y homogeneizados de encéfalos de TgVole descritos anteriormente. La preparación de los sustratos se llevó a cabo como se ha descrito en el apartado 6.2. El volumen de sustrato utilizado para cada ronda fue de 50 μ l. Los tubos utilizados fueron de 0.2 ml de pared fina (Axygen) y también se utilizaron partículas esféricas de zirconio – sílice de 1.0 mm para la homogeneización de los resultados. Tras una ronda de 24 h de PMCA se realizó una dilución 1:10 del producto de la primera ronda de PMCA en el mismo volumen de sustrato fresco y el proceso se repitió hasta la obtención del 100 % de tubos positivos para PrP^{res} o hasta alcanzar el número de rondas de PMCA deseadas. En cada experimento de este tipo se incluyeron duplicados de cada semilla, 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 rondas de PMCA. Además, se incluyó el mismo número de tubos sin semilla inicial en cada ronda, como control de generación espontánea de PrP^{res} o de contaminación cruzada. Por último, el tiempo del ciclo de incubación de la PMCA fue de 30 min, seguidos de pulsos de sonicación de 20 s, a una amplitud del 80 % y una temperatura media de 37 °C.

7. Detección de PrP malplegada

7.1. Digestión de PrP malplegada con proteinasa K

La digestión de las muestras con proteinasa K (PK) es el método más utilizado para la detección de PrP^{res} en cualquier tipo de muestras, ya sea procedente de técnicas de propagación *in vitro* como la PMCA o PMSA, *in cellula* o *in vivo*. Debido a que durante la realización de esta tesis doctoral se han utilizado tanto la PMSA como la PMCA como métodos de propagación de PrP malplegadas, el formato de la digestión y las condiciones fueron adaptadas al tipo de muestras utilizadas:

Muestras de PMCA basada en PrP recombinante complementada con homogeneizados de encéfalos KO-PrP: 10 μ l de cada muestra se diluyeron 1:2 en PBS con 10 % de Sarkosyl (N-Laurilsarcosine sodium salt, Sigma-Aldrich). A continuación, las muestras se digirieron utilizando una concentración de PK (Roche) de 85 μ g/ml durante 1 h a 42 °C en agitación constante de 450 rpm utilizando un *Thermomixer* (Eppendorf). Por último, el proceso de digestión se detuvo con la adición de 10 μ l de solución de carga NuPAGE (Invitrogen Life Technologies).

Muestras de PMCA basada en homogeneizados de encéfalos de ratones transgénicos: 10 μ l de las muestras obtenidas mediante este formato de PMCA se diluyeron 1:7 en PBS con 2% de Tween-20 (Sigma-Aldrich) + 2 % de Nonidet P40 (Sigma-Aldrich) + 5 % de Sarkosyl (Sigma-Aldrich). Las muestras se digirieron utilizando una concentración final de PK (Roche) de 150 μ g/ml durante 1 h a 56 °C en

agitación constante de 450 rpm utilizando un *Thermomixer* (Eppendorf). El proceso de digestión se detuvo también con la adición de 10 µl de solución de carga *NuPAGE* (Invitrogen Life Technologies).

Muestras de PMSA: las muestras de PMSA obtenidas por la utilización de semillas priónicas (en formato líquido o en formato de partículas esféricas adsorbidas con rec-PrP^{res}) o generadas de forma espontánea se digirieron con el objetivo de evaluar la presencia de rec-PrP^{res} mediante tinción de proteína total. Para ello, 400 – 500 µl de cada muestra obtenida se digirió utilizando una concentración de PK (Roche) de 25 µg/ml. Las muestras se incubaron durante 1 h a 42 °C sin agitación en una estufa de laboratorio (Nahita). Tras la hora de incubación, las muestras se centrifugaron a 1900 g durante 15 min a 4 °C (Centrífuga Sorvall Legend XTR, Thermo Scientific). El sobrenadante se descartó y se lavó el material precipitado con 700 µl de PBS y se volvió a centrifugar a 19 000 g durante 5 min a 4 °C. De nuevo el sobrenadante se descartó y el material precipitado se resuspendió en 15 µl de solución de carga *NuPAGE* (Invitrogen Life Technologies) diluida previamente 1:3 en PBS. Las muestras obtenidas mediante la utilización de partículas esféricas adsorbidas con rec-PrP^{res} y en presencia de compuestos potencialmente inhibidores se digirieron de igual forma.

Diluciones seriadas en PMSA en presencia de compuestos inhibidores: las diluciones de PMSA para la detección de compuestos con potencial anti-priónico se digirieron para evaluar el efecto sobre la propagación de los compuestos en estudio. Para ello, 10 µl de cada muestra se diluyeron 1:2 en PBS con 10 % de Sarkosyl (Sigma-Aldrich) y a continuación se digirieron utilizando una concentración de PK (Roche) de 25 µg/ml 1 h a 42 °C en agitación constante de 450 rpm utilizando un *Thermomixer* (Eppendorf). Por último, el proceso de digestión se detuvo con la adición de 10 µl de solución de carga *NuPAGE* (Invitrogen Life Technologies).

Para el estudio de resistencia a PK que se presenta en los apartados 5.1. y 5.3. de Resultados, las condiciones de digestión son idénticas a las descritas para las muestras de PMSA anteriormente, excepto la concentración final de PK utilizada, las cuales se indican en el apartado de Resultados correspondiente.

7.2. Detección de proteínas mediante electroforesis y tinción de proteína total con *BlueSafe*

La evaluación de la presencia o ausencia de rec-PrP^{res} en las muestras obtenidas mediante PMSA y digeridas con PK se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y posterior tinción de proteína total con la solución de tinción *BlueSafe* (Nzytech). Para ello, las muestras digeridas y resuspendidas en solución de carga *NuPAGE* se hirvieron durante 10 min a 100 °C y se cargaron en geles de poliacrilamida del 4 – 12 % utilizando el sistema *NuPage*®

Novex[®] (*NuPAGE Midi gel*, Invitrogen Life Technologies) y se llevó a cabo el proceso de electroforesis durante 1 h y 20 min (10 min a 70 V, 10 min a 110 V y 1h a 150 V). Tras la electroforesis se realizó la tinción total de proteína incubando el gel de electroforesis en solución de tinción de proteína total *BlueSafe* (Nzytech) durante 1 – 2 h a temperatura ambiente.

Para la tinción total de proteínas de las muestras sin digerir con PK que se presenta en el apartado 5.3. de Resultados se usó el mismo sistema de electroforesis y las mismas condiciones. Para la preparación de las muestras para la tinción total de proteínas, se realizaron diluciones seriadas 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16 en PBS de cada muestra. A 50 µl de cada dilución seriada se añadió 25 µl de solución de carga *NuPAGE* (Invitrogen Life Technologies). Por otro lado, 100 µl de cada muestra se centrifugó a 19 000 g durante 15 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. El material precipitado se resuspendió en 100 µl de PBS y se procedió de la misma forma para realizar las diluciones seriadas de esta fracción precipitada de cada muestra. Tras la obtención de todas las muestras, 15 µl de cada una se cargó en geles de poliacrilamida del 4 – 12 % y se procedió a realizar la electroforesis utilizando el sistema *NuPAGE*[®] *Novex*[®] (*NuPAGE Midi gel*, Invitrogen Life Technologies) con los mismos parámetros descritos anteriormente. Tras la electroforesis, se realizó la tinción de proteína total con *BlueSafe* (Nzytech).

7.3. Detección de proteínas mediante electroforesis y *Western Blot*

La detección de las PrP malplegadas mediante PMCA y las muestras de las diluciones seriadas para la búsqueda de compuestos inhibidores mediante PMSA se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida e inmunodetección por *Western Blot*. Para ello, una vez digeridas y resuspendidas en solución de carga *NuPAGE*, las muestras se hirvieron durante 10 min a 100 °C. La separación proteica se llevó a cabo mediante electroforesis SDS-PAGE. En todos los casos se utilizó para la separación electroforética de proteínas el sistema *Criterion TGX gel 4 – 15 %* (Bio-Rad) y se cargaron en el gel 16 µl de cada muestra. Tras la electroforesis, se procedió a la transferencia de las muestras utilizando membranas adsorbentes de difluoruro de polivinilideno (PVDF, del inglés *PolyVinylidene DiFluoride*) (*Trans-Blot Turbo Transfer Pack PVDF*, Bio-rad) y electrotransferencia con el equipo *Trans-Blot Turbo System* (Bio-Rad). El bloqueo de la membrana se realizó utilizando solución de bloqueo [PBS (Fisher Bioreagents), 5 % (p/v) leche deslipidada, 0.05 % (v/v) Tween-20 (Sigma-Aldrich)] durante 1 h. A continuación, la membrana se incubó con los anticuerpos primarios 3F4 (1:10 000) (Palex Medical) para la PrP humana, SAF83 (1:400) (Vitro S.A.) para la PrP de topillo rojo o D18 (1:5000) [397] para la PrP de oveja. Como anticuerpo secundario se utilizó el anticuerpo secundario policlonal anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Thermo Scientific Pierce) para los anticuerpos primarios SAF83 y 3F4 o el anticuerpo secundario policlonal anti-IgG de cabra conjugado con peroxidasa de

rábano para el anticuerpo primario D18. Tras la incubación de cada anticuerpo durante 1 h a temperatura ambiente se realizaron lavados con una solución de PBS (Fisher Reagents) + 0.05 % (v/v) de Tween-20 (Sigma-Aldrich). Por último, la membrana se reveló para la visualización de las bandas por quimioluminiscencia utilizando el kit *Super Signal West Pico* (Thermo Scientific Pierce) y la visualización de imágenes digitales se llevó a cabo utilizando el equipo *FluorChem Q* (Alpha Innotech) y el software *Alphaview* (Alpha Innotech).

7.4. Detección de fibras amiloides mediante Tioflavina T

La capacidad de la ThT de unirse con alta afinidad a las fibras amiloides provocando un aumento de su emisión de fluorescencia de forma directamente proporcional a la cantidad de fibras amiloides presentes en las muestras se ha utilizado para evaluar la formación de fibras amiloides en el campo de los priones, siendo de vital importancia en la RT-QuIC [317]. Por ello, se utilizó esta capacidad de la ThT para la detección y cuantificación a tiempo final de las fibras amiloides presentes en las muestras, tanto de PMSA para el cribado de los tetrapirroles como para la comparación de las PrP malplegadas obtenidas mediante PMSA, de las fibras Gdn y del material amorfo. Para ello, las muestras se diluyeron en proporción 1:5 en solución de medición [10 mM acetato sódico (Sigma-Aldrich), 22 μ M ThT (Sigma-Aldrich), ajustado a pH 6.0]. Esta mezcla se colocó en placas negras de 96 pocillos de fondo transparente *Costar® 96xwell black plate assay* (Corning), realizándose dos o tres repeticiones de cada una de las muestras, en función del experimento. A continuación, se introdujo la placa en el aparato *FLUOstar Optima* (BMG Labtech). Las muestras se incubaron 15 min a 45 °C en el interior del aparato y posteriormente se midió la fluorescencia. Las condiciones de medición utilizadas fueron las siguientes: longitud de onda de emisión a 450 nm y de recepción a 480 nm, ganancia a 2000 y 20 pulsos por muestra. Entre las muestras medidas siempre se incluyeron muestras no inoculadas como controles de ausencia de fibras. La medida de estas muestras se utilizó como control de autofluorescencia de la ThT en ausencia de fibras amiloides. El umbral de corte para la determinación y cuantificación inequívoca de las fibras amiloides se estableció como la media (σ) de los controles sin semilla más tres veces su desviación estándar (SD):

$$\text{Umbral de corte} = \sigma + 3 \times SD$$

Se estableció este valor como umbral basándonos en la regla estadística denominada “regla empírica”, la cual considera que casi todos los valores de una muestra se encuentran dentro del intervalo de más/menos tres desviaciones estándar de la media, con una probabilidad cercana al 100 % (99,73 %). De esta forma se cuantificó las fibras amiloides de cada muestra en función del incremento o diferencia de unidades relativas de fluorescencia (RFU, del inglés, *Relative Fluorescence Units*) con respecto al umbral de corte establecido:

$$\Delta RFU = \text{Media de RFU de la muestra} - \text{RFU del umbral de corte}$$

Por tanto, para determinar si una muestra es positiva o negativa, es decir, si ha habido propagación de PrP malplegada a niveles detectable o no, se siguió la siguiente regla:

Si ΔRFU de la muestra $>$ RFU del umbral de corte = positiva

Si ΔRFU de la muestra \leq RFU del umbral de corte = negativa

8. PMSA adaptada al cribado masivo de compuestos con potencial actividad anti-priónica específicos para PrP malplegada humana

El formato y parámetros utilizados para la búsqueda de inhibidores de la propagación priónica de rec-PrP^{res} humana fueron diferentes al formato de PMSA donde se generó dicha rec-PrP^{res} humana. Por ello, en primer lugar, fue necesario establecer los parámetros de PMSA para alcanzar una propagación seriada eficiente de la semilla humana V-E0, dado que el sistema está basado en diluciones seriadas de la semilla. Para ello, debido a que los tubos para el cribado de compuestos mediante PMSA utilizados eran de 0.2 ml (Axygen) se estableció 1000 rpm como velocidad de agitación y 39 °C como temperatura óptima para la propagación basándonos en la eficiente capacidad de propagación de las semillas recombinantes de topillo rojo en este formato de tubos [330]. Por tanto, el parámetro que se evaluó fue el volumen adecuado de reacción en el tubo de PMSA para permitir una propagación seriada eficiente de la semilla humana. Para ello, en tubos de 0.2 ml (Axygen) previamente rellenos con 250 mg partículas esféricas de zirconio – sílice de 1.0 mm (BioSpec Products) se llevaron a cabo las diluciones seriadas de la semilla (desde 1:10¹ hasta 1:10⁸) en un volumen final de 50, 125 o 180 µl. Todas las diluciones se sometieron a una ronda de PMSA de 24 h de duración a 1000 rpm utilizando un agitador – vórtex multiplaca de alta velocidad (MPS-1, Biosan) mantenido a 39 °C en estufa de laboratorio (Nahita). Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Tras la PMSA se determinó la dilución máxima a la que podía detectarse rec-PrP^{res}, lo que indicaba la eficiencia de propagación. Así, se establecieron finalmente como parámetros para la búsqueda de inhibidores de la propagación, diluciones seriadas de la semilla desde 1:10¹ hasta 1:10⁸ en presencia de partículas esféricas de zirconio – sílice de 1.0 mm, en un volumen final de 180 µl y PMSA de 24 h a 1000 rpm y 39 °C.

Para evaluar la capacidad de inhibición de los compuestos tetrapirrólicos y de los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85, una vez realizadas las diluciones seriadas de la semilla V-E0, se añadieron los compuestos a una concentración final de 100 o 50 µM. También se incluyó una dilución seriada con control de vehículo DMSO (Sigma-Aldrich) y 8 muestras no inoculadas como controles de ausencia de propagación, necesarias para la detección de fibras amiloides por ThT. Todas las diluciones se

sometieron a PMSA en las condiciones definidas y con los parámetros establecidos anteriormente utilizando de nuevo un agitador – vórtex multiplaca de alta velocidad (MPS-1, Biosan) y una estufa de laboratorio (Nahita) para mantener constante la temperatura. Las muestras se sometieron a una única ronda de PMSA de 24 h de duración. La capacidad de inhibición se determinó comparando la dilución máxima a la que se detectó propagación en presencia del compuesto en estudio, con la dilución máxima a la que se detectó propagación en el control DMSO. Se consideró alta capacidad de inhibición si provocaba una disminución de la propagación priónica de 1000 veces o más, baja capacidad de inhibición si la reducción era de 10 – 100 veces y sin capacidad de inhibir la propagación si la reducción era menor de 10 veces.

9. Adsorción de PrP recombinante malplegada a partículas esféricas y propagación por PMSA

Para testar la capacidad de las rec-PrP^{res} humanas espontáneas de adsorberse a las partículas esféricas y la capacidad de estas una vez adsorbidas de funcionar como semillas en PMSA, se llevó a cabo una propagación por PMSA de las cuatro rec-PrP^{res} humanas en presencia de partículas esféricas de zirconio – sílice de 1.0 mm de diámetro. Para ello, en primer lugar, las partículas esféricas se lavaron tres veces con PBS (Fisher reagements) y una última vez con H₂O estéril libre de nucleasas (Amresco, VWR International Eurolab) mediante agitación en vórtex. En tubos de tipo eppendorf de 2.0 ml con fondo cónico (Thermo Scientific) se añadió aproximadamente 250 mg de partículas esféricas lavadas y se agregó 800 µl de sustrato recombinante humano M129 o V129 según la semilla priónica utilizada. Seguidamente, se añadió la semilla en proporción 1:100 (semilla:sustrato). Todos los tubos con sustrato y semilla se sometieron a dos rondas seriadas de PMSA de 24 h, 1000 rpm y 39 °C utilizando un termobloque con agitación (*Digital Shaking Drybath*, Thermo Scientific), utilizando para la segunda ronda de PMSA las mismas partículas esféricas utilizadas en la primera ronda de PMSA. El objetivo de esto fue conseguir una mayor cantidad de PrP malplegada adherida a la superficie de las partículas esféricas. Antes de llevar a cabo la segunda ronda de PMSA las partículas esféricas usadas en la primera ronda se sometieron al mismo proceso de lavado con PBS y H₂O estéril libre de nucleasas. El producto de la primera ronda se diluyó de nuevo 1:100 en sustrato fresco para llevar a cabo la segunda ronda de PMSA. El número de replicas realizadas varió en función de la cantidad de partículas esféricas que se quería conseguir, utilizando normalmente de 6 a 8 tubos de réplicas. Tras la primera ronda de PMSA al material generado en todos los tubos se juntó y se homogeneizó para poder llevar a cabo la segunda ronda seriada de PMSA. Además, se analizó la presencia o no de rec-PrP^{res} mediante digestión con PK y tinción de proteína total.

Tras las dos rondas seriadas de PMSA para la obtención de partículas esféricas con PrP recombinante malplegada adsorbida en su superficie, se llevaron a cabo diferentes experimentos de PMSA para determinar la capacidad de estas partículas esféricas de actuar como semilla para el malplegamiento del sustrato recombinante humano. Antes de su utilización como semilla, las partículas esféricas con rec-PrP^{res} adsorbidas se lavaron tres veces con PBS (Fisher reagements) y una última vez con H₂O estéril libre de nucleasas mediante agitación en vórtex, con el objetivo de eliminar cualquier posible resto de rec-PrP^{res} arrastrada con las partículas esféricas, pero no adsorbida, y asegurar así que el malplegamiento del sustrato se debe al efecto de las partículas esféricas adsorbidas. Posteriormente, las partículas esféricas con rec-PrP^{res} adsorbidas se secaron y deshidrataron en estufa de laboratorio a 42 °C durante 6 – 8 h para su correcta conservación a temperatura ambiente [398]. De forma general, las rondas de PMSA con partículas esféricas con rec-PrP^{res} adsorbida como semillas se llevaron a cabo en tubos de tipo eppendorf de 2 ml con fondo cónico (Thermo Scientific) donde previamente se había colocado el número de partículas esféricas adsorbidas necesarias para cada experimento y a los que posteriormente se añadieron 500 µl del sustrato recombinante humano M129 o V129. La velocidad de agitación y duración de las rondas de PMSA llevadas a cabo se indican en el apartado correspondiente de Resultados, habiéndose utilizado velocidades de agitación desde 250 rpm hasta 1200 rpm y duración de las rondas desde 1 h hasta 24 h. Los experimentos se llevaron a cabo en un termobloque con agitación (*Digital Shaking Drybath*, Thermo Scientific) a una temperatura constante de 39 °C. En aquellos experimentos donde fue necesario la utilización de un control sin semilla estos se prepararon de igual forma, pero se utilizaron partículas esféricas de zirconio – sílice de 1.0 mm sin rec-PrP^{res} en su superficie.

10. PMSA basada en partículas esféricas adsorbidas adaptada al cribado masivo de compuestos con potencial actividad anti-priónica

La prueba de concepto para la búsqueda de inhibidores mediante la nueva metodología de propagación priónica basada en partículas esféricas con PrP malplegada adsorbida en su superficie se llevó a cabo con el Tetrapirrol control, el Tetrapirrol 8, el Tetrapirrol 13 y la doxiciclina (un compuesto no relacionado estructuralmente con los anteriores). Además, se colocaron tubos con vehículo DMSO como control de propagación y tubos sin semilla como control de posible generación espontánea de rec-PrP^{res} o de contaminación cruzada, además de ser necesarios para medir la autofluorescencia de la ThT en ausencia de fibras. En tubos de tipo eppendorf de 2 ml con fondo cónico, se colocaron 3 partículas esféricas con la semilla V-E0 adsorbida en su superficie o tres partículas esféricas de zirconio – sílice de 1.0 mm lavadas sin rec-PrP^{res} en su superficie para los controles negativos. A continuación, se añadió a cada tubo 500 µl de sustrato recombinante humano V129 y se procedió a añadir los

compuestos a testar a una concentración final de 50 o 10 μM . Una vez preparados, todos los tubos fueron sometidos a una ronda de PMSA de duración variable (4, 6, 12 o 24 h) con una agitación de 1000 rpm y temperatura constante de 39 $^{\circ}\text{C}$ gracias al uso de termobloques con agitación (*Digital Shaking Drybath*, Thermo Scientific). Los compuestos se ensayaron por duplicado o triplicado. Tras la PMSA se evaluó la presencia de rec-PrP^{res} en cada muestra mediante digestión con PK y tinción de proteína total de las mismas y espectrometría de fluorescencia con ThT para determinar así la capacidad de inhibición de los compuestos seleccionados mediante esta nueva metodología de propagación priónica *in vitro*.

RESULTADOS

1. Especificidad de especie y cepa de los compuestos inhibidores detectados mediante un sistema de cribado masivo desarrollado con PrP de topillo rojo

El cribado masivo de una biblioteca comercial de compuestos de bajo peso molecular y alta diversidad química (Ro3 Maybridge) realizado gracias al desarrollo de la técnica de propagación de priones *in vitro* PMSA, y su subsecuente adaptación a la búsqueda de compuestos anti-priónicos, identificó tres nuevas moléculas inhibidoras de la propagación priónica *in vitro* (L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85) [332]. Con el objetivo de confirmar la actividad anti-priónica mediante un sistema alternativo de propagación de priones *in vitro* más parecida a la situación *in vivo*, teniendo en cuenta que el cribado se efectuó mediante un sistema de PMSA basado exclusivamente en la rec-PrP de topillo rojo, se llevaron a cabo una serie de PMCA utilizando sustratos que contenían PrP de distintas especies, tanto en formato recombinante (rec-PrP) como en formato celular (PrP^C). Las rec-PrP se complementaron con encéfalos de ratones KO-PrP y las distintas PrP^C se obtuvieron mediante el uso de encéfalos de diferentes especies. Este estudio permitió a su vez conocer la especificidad de especie de cada uno de los tres compuestos. Para ello se utilizaron semillas PrP^{Sc} homólogas para cada una de las diferentes especies realizando la propagación tras su dilución seriada en presencia de los tres compuestos inhibidores indicados anteriormente. Tras 24 h de PMCA, se determinó la reducción en la propagación de priones de cada especie atendiendo a las diluciones de semilla máximas en las que se observó PrP malplegada respecto a la dilución máxima alcanzada por los respectivos controles [vehículo dimetilsulfóxido (DMSO)]. De acuerdo con los resultados que se muestran en la Tabla 2 y considerando que una reducción igual o mayor de 1000 veces respecto a la dilución máxima de semilla que permitía una propagación detectable, suponía una alta inhibición, de 10 – 100 veces para una inhibición moderada y menos de 10 veces para ausencia de inhibición, se observó que los tres compuestos presentan especificidad de especie, aunque con diferentes grados. El compuesto L2.JM56 exhibe un espectro de acción más amplio, ya que fue capaz de inhibir la propagación de priones en todas las especies testadas, tanto en formato recombinante como celular, aunque en este último formato la eficiencia de inhibición mostrada fue más reducida. Sin embargo, los compuestos L2.JM33 y L2.JM85 presentan una mayor especificidad en la inhibición. El compuesto L2.JM33 tiene un menor potencial anti-priónico, ya que mostró una inhibición baja (1×10^1 con respecto al control DMSO) de la propagación priónica en topillo rojo y oveja, aunque con una eficiencia aumentada (1×10^3 con respecto al control DMSO) cuando se utilizó como sustrato la proteína recombinante humana. Por el contrario,

en un ambiente de homogeneizado de encéfalo, este compuesto no consiguió disminuir la propagación en ninguna de las especies testadas. Por último, el compuesto L2.JM86 presenta una elevada especificidad de especie, ya que solo mostró capacidad de inhibición con priones de oveja, tanto en formato recombinante como en formato con homogeneizado de encéfalo. En esta especie mostró una alta inhibición, de 1×10^3 con respecto al control DMSO.

Tabla 2. Capacidad de los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85 de inhibir la propagación priónica *in vitro* utilizando PrP recombinantes u homogeneizados de encéfalos de distintas especies como sustrato de PMCA. Se muestra la capacidad de cada compuesto para inhibir la propagación de priones recombinantes o de origen encefálico de distintas especies con respecto al control con vehículo DMSO. Se indica con color verde el tipo de sustrato y la PrP de la especie que contiene, donde el compuesto es capaz de reducir la propagación priónica 1000 veces o más, de color naranja el tipo de sustrato/especie donde el compuesto reduce la propagación priónica entre 10 – 100 veces y de rojo el tipo de sustrato/especie donde el compuesto reduce menos de 10 veces la propagación de las semillas priónicas. En cada caso, se detalla la diferencia entre la dilución máxima alcanzada en presencia del compuesto respecto al control. La concentración final de cada compuesto es de 500 μ M. rec-Topillo rojo PrP: sustrato con PrP recombinante de topillo rojo con el polimorfismo I109; rec-Oveja ARQ PrP: sustrato recombinante con PrP recombinante de Oveja con el polimorfismo ARQ; rec-Humano M129 PrP: sustrato recombinante con PrP humana M129. TgVole: encéfalo del modelo murino que expresa la PrP^C de topillo rojo; Tg338: encéfalo del modelo murino que expresa la PrP^C de oveja con el polimorfismo VRQ; TgWV: encéfalo del modelo murino que expresa la PrP^C humana con el polimorfismo V129 DMSO: dimetilsulfóxido, usado como control del vehículo en el que se disuelven los compuestos testados.

Compuesto	Tipo de sustrato / Especie		Inhibición respecto al control DMSO
L2.JM33	Recombinante (rec-PrP)	rec-Topillo rojo PrP	1×10^1
		rec-Oveja ARQ PrP	1×10^1
		rec-Humano M129 PrP	1×10^3
	Homogeneizado de encéfalo (PrP ^C)	TgVole	No inhibe
		Tg338	No inhibe
		TgWV	No inhibe
L2.JM56	Recombinante (rec-PrP)	rec-Topillo rojo PrP	1×10^8
		rec-Oveja ARQ PrP	1×10^8
		rec-Humano M129 PrP	1×10^5
	Homogeneizado de encéfalo (PrP ^C)	TgVole	1×10^2
		Tg338	1×10^5
		TgWV	1×10^1
L2.JM85	Recombinante (rec-PrP)	rec-Topillo rojo PrP	No inhibe
		rec-Oveja ARQ PrP	1×10^3
		rec-Humano M129 PrP	No inhibe
	Homogeneizado de encéfalo (PrP ^C)	TgVole	No inhibe
		Tg338	1×10^3
		TgWV	No inhibe

2. Generación de PrP recombinantes humanas malplegadas mediante PMSA

Dada la especificidad de especie que pueden presentar muchos de los compuestos con actividad anti-priónica detectados mediante sistemas de cribado masivo, se planteó el objetivo de adaptar la metodología de cribado desarrollada previamente en nuestro laboratorio, la cual está basada en el sistema *in vitro* PMSA y en priones recombinantes de topillo rojo [332], a la búsqueda de compuestos anti-priónicos específicos contra las EET humanas. Para ello, en primer lugar, fue necesario obtener priones recombinantes humanos con características adecuadas para el cribado de compuestos. Así, los

priones recombinantes humanos deberían mostrar las características de un prion *bona fide*, es decir, capacidad auto-propagativa, resistencia a la digestión por proteasas y capacidad de propagarse en modelos animales.

2.1. Generación de PrP recombinantes humanas malplegadas mediante el uso de cepas priónicas humanas de origen encefálico

Basándonos en la experiencia previa del laboratorio en la obtención de priones recombinantes de diferentes especies, mediante el uso de cepas priónicas de origen encefálico a modo de semillas inductoras del malplegamiento, tanto en PMCA [258] como en PMSA [330], se seleccionaron diferentes cepas priónicas humanas provenientes de encéfalos humanos con el fin de inducir el malplegamiento *bona fide* de la rec-PrP humana. Cabe destacar que los priones recombinantes de otras especies obtenidos anteriormente en el laboratorio son infecciosos en modelos animales [330], lo que respaldaba esta estrategia para la obtención de priones recombinantes *bona fide* humanos idóneos para la búsqueda de compuestos anti-priónicos. El uso de diferentes cepas encefálicas humanas se justifica dado que cada una de ellas presenta una capacidad auto-propagativa diferente en los distintos sistemas de propagación *in vitro* e *in vivo*. Así, se esperaba aumentar las posibilidades de obtener priones recombinantes humanos con características similares a las semillas seleccionadas y con diferentes propiedades bioquímicas y biológicas, de interés para aquellos compuestos que pudieran presentar especificidad de cepa. Para ello, se seleccionaron las siguientes cepas humanas: sCJD MM1, sCJD MV2, sCJD VV1 y sCJD VV2 (MM, MV o VV hace referencia a la variante polimórfica del codón 129 de la PrP^{Sc} y 1 o 2 hace referencia al tipo 1 o tipo 2 de cepa priónica basado en su patrón electroforético tras digestión con PK). Con el objetivo de concentrar la PrP^{Sc} de origen encefálico y de eliminar diferentes componentes o cofactores presentes en el encéfalo que pudieran inhibir el proceso, se purificaron tras su precipitación a través de un colchón de sacarosa al 30 % (p/v). Esto permitió aumentar las posibilidades de conseguir el malplegamiento de la PrP recombinante humana, además de evitar la aparición de mezclas de diferentes conformeros recombinantes, fenómeno que se ha demostrado que puede ocurrir cuando se complementa rec-PrP con homogenizados de encéfalos KO-PrP [258]. Las distintas cepas humanas semi-purificadas tras la centrifugación se utilizaron como semillas en PMSA con el fin de inducir el malplegamiento de las dos variantes polimórficas recombinantes humanas (M129 y V129). Estos dos tipos de sustratos recombinantes humanos se nombran a lo largo de esta tesis doctoral como sustratos rec-Hu M129 PrP y rec-Hu V129 PrP, respectivamente. Cada semilla se diluyó 1:10 en los sustratos mencionados y se sometieron a 24 h de propagación por PMSA en presencia de partículas esféricas de zirconio-sílice de 1.0 mm de diámetro, que se ha demostrado que favorece el proceso de malplegamiento. El producto de la primera ronda

se volvió a diluir 1:10 en sustrato fresco y el procedimiento se repitió sucesivamente hasta realizar cuatro rondas seriadas de PMSA. Tal y como se muestra en la Figura 7 a, salvo cuando se utilizó la semilla sCJD MV2 en el sustrato rec-Hu V129 PrP, en ninguna de las rondas seriadas efectuadas en los dos tipos de sustratos se observó la generación de material resistente a PK. En el caso de la cepa sCJD MV2 propagada en el sustrato rec-Hu V129 PrP se observó un material resistente a la digestión con PK en la ronda 2 de PMSA que se mantuvo hasta la ronda 4. Concretamente, se obtuvo un patrón de bandas electroforético donde se observaba una banda de ~16 kDa, que se correspondería con el fragmento ~90-230 resistente a proteasas característico de los priones *bona fide*, así como otros fragmentos proteolíticos de menor tamaño, que indicarían diferentes sitios de cortes internos dentro del núcleo resistente de la rec-PrP malplegada (Figura 7 b). Por tanto, tras la obtención de estos resultados se decidió llevar a cabo 4 rondas más de PMSA en las mismas condiciones incluyendo únicamente la cepa sCJD MV2 en sustrato rec-Hu V129 PrP para determinar si era capaz de propagar de forma ilimitada manteniendo el patrón de bandas electroforético deseado (Figura 7 a y b). Sin embargo, la digestión con PK de los productos de las nuevas rondas de PMSA mostraron la desaparición de la banda de ~16 kDa en ronda 8, dando lugar únicamente a los fragmentos de menor tamaño (Figura 7 b). Estas bandas correspondientes a fragmentos de bajo peso molecular se observaron también en las rondas de PMSA con sustrato rec-Hu V129 PrP que no dieron lugar a la banda de 16 kDa, como en el caso de la semilla sCJD VV1 (Figura 7 c). Además, también aparecen en aquellas reacciones en las que no se añadió semilla alguna al sustrato rec-Hu V129 PrP, realizadas como control de la generación espontánea de material resistente a PK. Dichos fragmentos no aparecieron en los controles de espontaneidad con sustrato rec-Hu M129 PrP (Figura 7 d), lo que podría indicar que la generación de este tipo de fragmentos de bajo peso molecular no se debe a la inducción del malplegamiento por la semilla si no que se tratan de agregados que se forman artefactualmente como consecuencia del procedimiento realizado. Por tanto, esta estrategia basada en la utilización de semillas encefálicas humanas no favoreció el malplegamiento de tipo priónico de la rec-PrP humana de forma consistente. Los productos resistentes a PK obtenidos tras la inducción con la semilla sCJD MV2 finalmente no presentaron todas las características requeridas para considerarlos priones *bona fide* humanos, dado que no mantuvieron indefinidamente una capacidad auto-propagativa en las rondas sucesivas de PMSA.

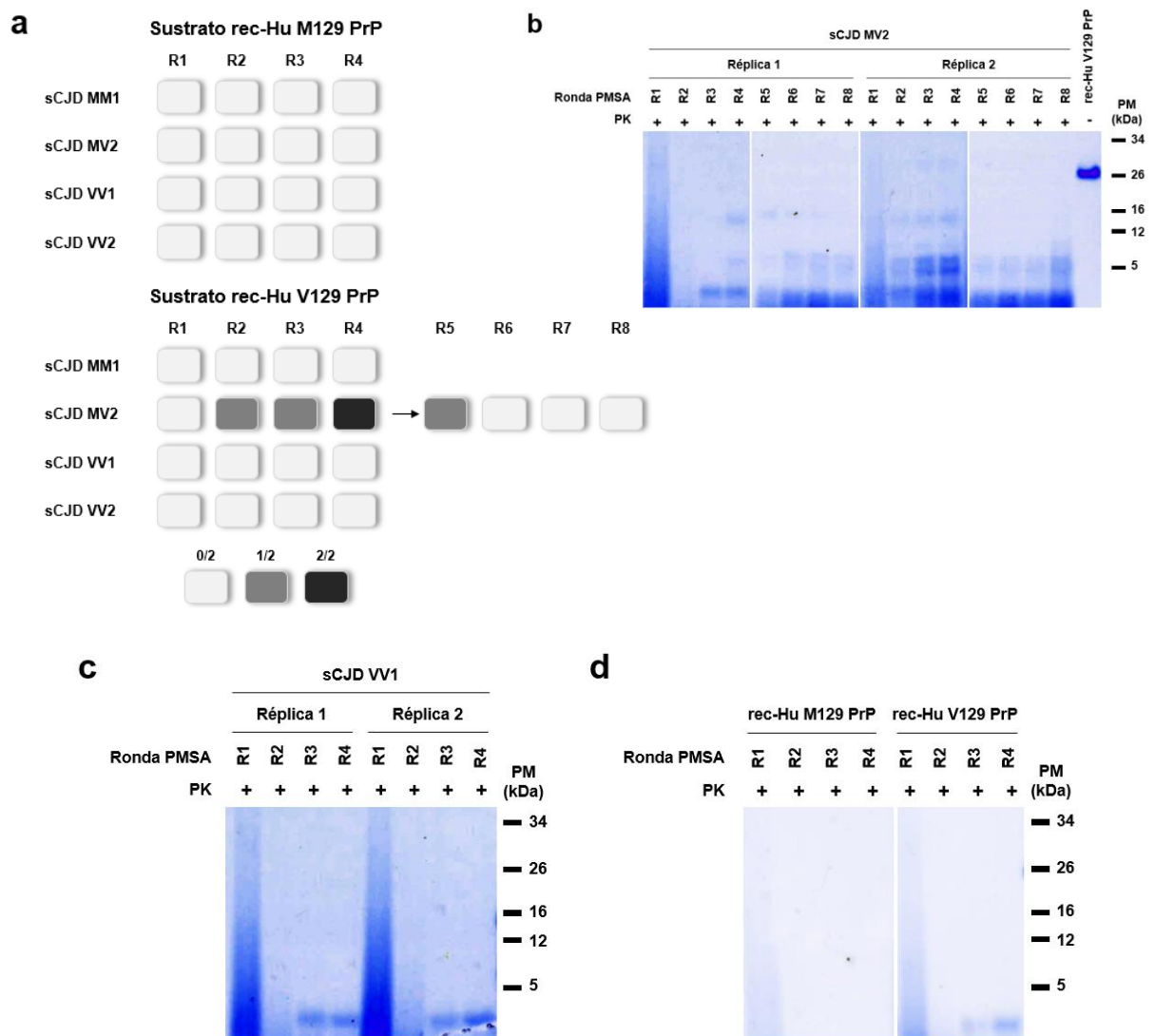


Figura 7. Estudio de la capacidad de propagación por PMSA en sustrato recombinante humano de las cepas priónicas humanas de origen encefálico. **a)** Representación gráfica de la generación de PrP recombinante resistente a proteinasa K (PK) (rec-PrP^{res}) humana M129 (Sustrato rec-Hu M129 PrP; panel superior) y V129 (Sustrato rec-Hu V129 PrP; panel inferior) tras la propagación *in vitro* mediante PMSA de las cepas priónicas humanas de origen encefálico sCJD MM1, sCJD MV2, sCJD VV1 y sCJD VV2 (donde MM, MV o VV hace referencia a la variante polimórfica del aminoácido 129 de la PrP^{Sc} y 1 o 2 al tipo 1 o tipo 2 de cepa priónica basado en su patrón electroforético tras digestión con PK). Los productos de cada ronda de PMSA se digirieron con 25 µg/ml de PK y se evaluó la presencia de rec-PrP^{res} mediante electroforesis y tinción de proteína total. Cada semilla encefálica se diluyó 1:10 en los sustratos recombinantes y se sometieron a rondas seriadas (a dilución 1:10) de PMSA de 24 h de duración. Todas las cepas priónicas se testaron por duplicado. El número de tubos con rec-PrP^{res} detectable tras cada ronda de PMSA se ha señalado con distintas intensidades de gris, tal y como se indica en la leyenda situada en la parte inferior de la figura. **b)** Electroforesis y tinción de proteína total de los productos de las rondas seriadas de PMSA de la cepa sCJD MV2 en sustrato recombinante humano V129 tras su digestión con PK. Se visualizan de forma tenue las bandas de ~16 kDa que se corresponden con el fragmento de aminoácidos ~90 – 230 resistente a proteasas característico de priones *bona fide* solo en las rondas de 4 a 6 en la Réplica 1 del experimento y en las rondas de 2 a 4 de la Réplica 2. En todas las rondas de PMSA se observan fragmentos de bajo peso molecular (≤ 5 kDa) resistentes a la digestión con PK. rec-Hu V29 PrP: sustrato recombinante humano V129 sin digerir; PK: Proteínasa K; PM: marcador de peso molecular. **c)** Electroforesis y tinción de proteína total de los productos de las rondas seriadas de PMSA de la cepa sCJD VV1 en sustrato recombinante humano V129 tras su digestión con PK. No se observa generación de rec-PrP^{res} humana V129 en ninguna de las rondas llevadas a cabo (R1 – R4) en ambas réplicas, mientras que se observa la aparición de fragmentos resistentes a PK de bajo peso molecular (≤ 5 kDa) en todas las rondas de PMSA. PK: Proteínasa K; PM: marcador de peso molecular. **d)** Electroforesis y tinción de proteína total de los productos de las rondas seriadas a dilución 1:10 en sustrato recombinante humano M129 (rec-Hu M129 PrP) y V129 (rec-Hu V129 PrP) en ausencia de semilla priónica como control de la generación espontánea de rec-PrP^{res} tras su digestión con PK. No se observa malplegamiento espontáneo de la PrP recombinante en ninguno de los sustratos. Se observa, por el contrario, aparición de fragmentos de bajo peso molecular (≤ 5 kDa) en las rondas 3 y 4 de las reacciones de PMSA sin semilla con el sustrato recombinante humano V129. PK: Proteínasa K; PM: marcador de peso molecular.

La observación de un patrón bioquímico similar al malplegamiento esperado en una de las muestras, nos llevó a realizar un intento más de obtención de priones recombinantes humanos mediante la inducción con semillas de origen encefálico. Para ello, se llevaron a cabo 4 rondas seriadas de PMSA aumentando la dilución inicial de la semilla sCJD MV2, evitando de esta forma que algunos componentes encefálicos pudieran interferir en el proceso de inducción del malplegamiento. Esto se decidió basándose en que en nuestro laboratorio se había conseguido malplegar la rec-PrP de topillo rojo y de ratón por PMSA mediante el uso de diluciones altas de semillas encefálicas de dichas especies, y no con diluciones menores. Se cree que puede haber algún componente en el encéfalo que en altas concentraciones podría inhibir la inducción del malplegamiento mediada por las semillas contenidas en este. Sin embargo, la realización de 4 rondas seriadas con diluciones 1:1000 de la semilla en la ronda 1 y dilución 1:10 en las posteriores rondas de PMSA, no favoreció el malplegamiento del sustrato rec-Hu M129 PrP ni del sustrato rec-Hu V129 PrP (Figura 8), ya que no se obtuvo material resistente a PK en ninguna de las condiciones utilizadas.

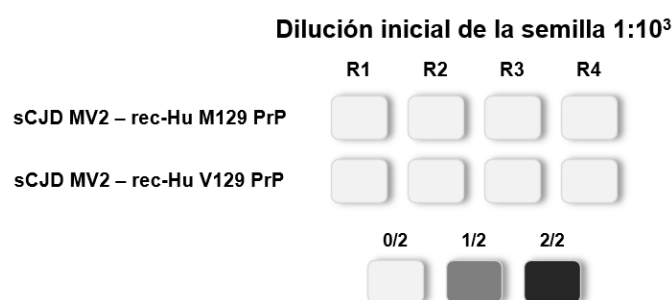


Figura 8. Estudio de la capacidad de propagación por PMSA de la cepa priónica humana sCJD MV2 con una dilución inicial de la semilla de 1:10³. Representación gráfica del experimento de generación de PrP recombinante resistente a proteasa K (rec-PrP^{res}) M129 (sCJD MV2 - rec-Hu M129 PrP) y V129 (sCJD MV2 - rec-Hu V129 PrP) mediante rondas seriadas de PMSA de la cepa priónica humana de origen encefálico sCJD MV2. Se utilizó una dilución 1:1000 de la semilla priónica en sustrato recombinante para la ronda 1 (R1) de PMSA y una dilución 1:10 del producto de la ronda anterior para las sucesivas rondas de PMSA (R2 – R4), todas de 24 h de duración. Los productos de cada ronda de PMSA se digirieron con PK a 25 µg/ml y se evaluó la presencia de rec-PrP^{res} mediante electroforesis y tinción de proteína total. El experimento completo se llevó a cabo por duplicado. El número de tubos con rec-PrP^{res} detectable tras cada ronda de PMSA se ha señalado con distintas intensidades de gris, tal y como se indica en la leyenda situada en la parte inferior de la figura, siendo todos negativos en este caso.

2.2. Generación espontánea de PrP recombinantes humanas malplegadas mediante PMSA

Ante la ausencia de malplegamiento de las dos variantes polimórficas humanas tras su inducción mediante el uso de semillas de origen encefálico, decidimos provocar el malplegamiento *bona fide* de dichas proteínas de forma espontánea mediante PMSA. Esta estrategia viene avalada por los resultados previos obtenidos en el laboratorio que muestran la obtención consistente de

malplegamientos proteicos de forma espontánea por PMSA mediante el uso de sustratos basados en rec-PrP de diferentes especies; en presencia de dextrano sulfatado como cofactor. Las proteínas malplegadas obtenidas de esta forma presentan las propiedades bioquímicas y biológicas que caracterizan a un prion *bona fide*, como la alta capacidad de propagación indefinida, resistencia a la digestión con PK y capacidad de provocar una enfermedad priónica en distintos modelos animales (resultados pendientes de publicación). Además, teniendo en cuenta que las enfermedades priónicas humanas de origen espontáneo representan a la gran mayoría de EET humanas, la obtención de cepas priónicas humanas de forma espontánea suponía un valor añadido para la búsqueda de compuestos anti-priónicos, ya que podrían mimetizar las características de las cepas priónicas humanas causantes de la patología esporádica. Con el objetivo de aumentar las posibilidades de conseguir una cepa humana recombinante espontánea se usaron como sustrato, además de las rec-PrP humanas WT utilizadas previamente, rec-PrP humanas que portaban la mutación M109I, la cual es una variante alélica natural del topillo rojo y de otras especies de mamíferos que ha demostrado incrementar su propensión al malplegamiento espontáneo tanto *in vivo* [91] como *in vitro* [258]. Por tanto, además de los sustratos rec-Hu M129 PrP y rec-Hu V129 PrP, se incluyeron los sustratos rec-Hu M109I M129 PrP y rec-Hu M109I V129 PrP para la obtención espontánea de rec-PrP^{res} humanas. Cada sustrato, basado únicamente en rec-PrP, sales, detergentes y dextrano sulfatado al 0.5 % (p/v) como cofactor, se sometió a sucesivas rondas seriadas de PMSA en presencia de partículas esféricas de vidrio de 0.1 – 0.2 mm de diámetro que favorecen la generación espontánea de rec-PrP^{res} en otras especies (resultados aun no publicados). En ausencia de PrP^{Sc} como semilla, los sustratos mencionados se sometieron a una ronda de 24 h de PMSA y se efectuaron diluciones 1:10 del material de la ronda anterior en sustrato fresco para llevar a cabo la siguiente ronda de PMSA, hasta alcanzar 5 rondas seriadas. Tras la digestión del producto de cada ronda de PMSA con PK y su visualización mediante tinción de proteína total, no se detectó rec-PrP^{res} con el fragmento característico de ~16 kDa con los sustratos rec-Hu M129 PrP y rec-Hu V129 PrP (Figura 9 a). Sin embargo, los sustratos rec-Hu M109I M129 PrP y rec-Hu M109I V129 PrP dieron lugar a material resistente a PK a partir de la segunda ronda de PMSA, de acuerdo con la esperada mayor propensión al malplegamiento espontáneo debido a la I109, presentando mayor eficiencia para la espontaneidad el sustrato rec-Hu M109I V129 PrP que el sustrato rec-Hu M109I M129 PrP (Figura 9 a). En la Figura 9 b se puede observar el patrón de bandas electroforético de cada rec-PrP^{res} obtenida en la ronda 5 de PMSA. En el caso de la rec-PrP^{res} obtenida a partir del sustrato rec-Hu M109I M129 PrP se observa solo la banda correspondiente a ~16 kDa, mientras que en la obtenida con el sustrato rec-Hu M109I V129 PrP se observan además otras bandas correspondientes a fragmentos de menor peso molecular. No obstante, la obtención de malplegamiento espontáneo a partir de la segunda ronda seriada de PMSA aun en presencia de la mutación I109, contrastaba con los resultados obtenidos en especies como el topillo rojo o ratón, en

los que la presencia de esta misma variante aminoacídica permite obtener de forma consistente rec-PrP^{res} desde la primera ronda. Este resultado sugería, por tanto, que la metodología de PMSA utilizada, desarrollada para estos modelos de roedores podría no ser óptima para las PrP humanas, que parecen presentar una menor propensión al malplegamiento espontáneo tanto en presencia como en ausencia de la mutación M109I. Por ello, ante la posibilidad obtener rec-PrP^{res} espontáneamente en una sola ronda de PMSA para otras especies tanto en presencia de I109 como en sus respectivas versiones silvestres o WT, decidimos tratar de optimizar los parámetros del sistema para incrementar la eficiencia del malplegamiento de las PrP humanas, viendo que al menos en presencia de la I109, este malplegamiento espontáneo era posible incluso en condiciones adaptadas para PrP de otras especies. Dado que este método de malplegamiento espontáneo en presencia de dextrano sulfatado había dado lugar previamente a priones recombinantes *bona fide* de forma consistente tanto para el topillo rojo como para el ratón, se decidió descartar la inducción del malplegamiento por semillas encefálicas y centrarse en la vía de obtención espontánea.

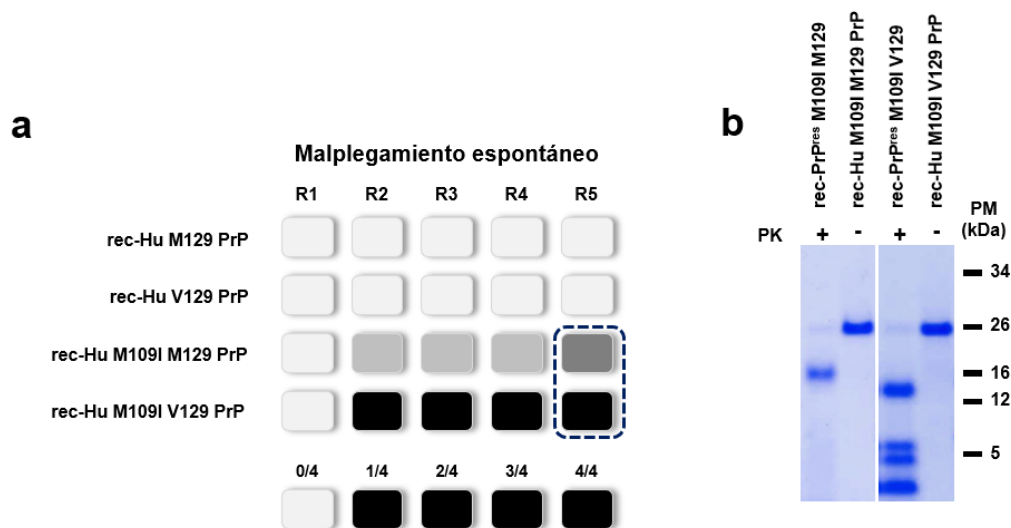


Figura 9. Estudio de la capacidad de malplegamiento espontáneo de las PrP recombinantes humanas mediante la metodología original de PMSA desarrollada para PrP recombinante de roedor. **a)** Representación gráfica de la generación de PrP recombinante malplegada (rec-PrP^{res}) humana de forma espontánea (sin semilla priónica) mediante rondas seriadas (R1 – R4) de PMSA a dilución 1:10. La evaluación de la generación de rec-PrP^{res} de forma espontánea se llevó a cabo mediante la digestión con 25 µg/ml de proteinasa K (PK) del producto de cada ronda de PMSA, electroforesis y posterior tinción de proteína total. La capacidad de malplegarse de forma espontánea de cada tipo de sustrato se ensayó por cuadruplicado. El número de tubos con rec-PrP^{res} detectable tras cada ronda de PMSA se ha señalado con distintas intensidades de gris, tal y como se indica en la leyenda situada en la parte inferior de la figura. Únicamente se observó malplegamiento espontáneo para las PrP recombinantes con la mutación puntual I109, detectada en la segunda ronda de PMSA tanto para el polimorfismo M129 como V129, pero con mayor eficiencia para esta última, con el 100% de los tubos positivos. Se indica con un recuadro azul de línea discontinua la ronda de PMSA de la cual proceden los productos digeridos con PK que se muestran en el panel b. **b)** Electroforesis y tinción de proteína total de una de las réplicas en las que se obtuvo rec-PrP^{res} con el sustrato rec-Hu M109I M129 PrP y rec-Hu M109I V129 tras la digestión con PK de ambos productos. Se observa que los productos resistentes a PK obtenidos en la quinta ronda de PMSA con cada uno de los sustratos recombinantes M109I presentan un patrón de bandas electroforético diferente. rec-PrP^{res} M109I M129: PrP recombinante humana M109I M129 malplegada de forma espontánea en ronda 5 de PMSA; rec-PrP^{res} M109I V129: PrP recombinante humana M109I V129 malplegada de forma espontánea en ronda 5 de PMSA; rec-Hu M109I M129 PrP: sustrato recombinante humano M109I M129 sin digerir; rec-Hu M109I V129 PrP: sustrato recombinante humano M109I V129 sin digerir; PK: Proteinasa K; PM: marcador de peso molecular.

3. Adaptación de los parámetros del sistema de PMSA para la generación espontánea de PrP recombinantes humanas malplegadas

Tras comprobar que el sistema de PMSA original permite el malplegamiento espontáneo de la rec-PrP humana con la mutación M109I, pero no permite el malplegamiento de las isoformas WT, se decidió llevar a cabo una optimización de los parámetros más relevantes que inciden sobre la eficiencia del malplegamiento espontáneo para favorecer específicamente el malplegamiento de los sustratos rec-Hu M129 PrP y rec-Hu V129 PrP. De esta forma, el sistema de PMSA se sometió a una serie de optimizaciones y mejoras secuenciales con el objetivo de aumentar la eficiencia del malplegamiento espontáneo de las diferentes rec-PrP humanas, incluyendo las que portan la variante polimórfica de la PrP del topillo rojo como indicadores.

El proceso de optimización consistió en modificar de forma secuencial una de las variables implicadas en el proceso, manteniendo sin modificar el resto. Las modificaciones sobre cada variable se evaluaron mediante el método experimental adaptado a la naturaleza de la variable eligiéndose en cada caso aquella modificación que mostraba un mejor resultado. Las variables más relevantes de acuerdo con nuestra experiencia previa con PrP de roedores, eran la calidad y concentración de rec-PrP en el sustrato, la utilización de distintas partículas esféricas y la velocidad de agitación empleada. Los parámetros iniciales de partida desarrollados específicamente con rec-PrP de roedor y con las que se ha trabajado hasta el momento eran: agitación continua a 1000 rpm y 39°C en presencia de partículas esféricas de vidrio de 0.1 – 0.2 mm y una concentración de rec-PrP de aproximadamente 2 μ M. En los siguientes apartados se desglosan las modificaciones realizadas con la intención de adaptar el sistema específicamente al uso de rec-PrP humanas.

3.1. Mejoras en el sustrato

Uno de los principales parámetros susceptible de ser modificado es el sustrato utilizado como fuente de rec-PrP en la técnica, el cual está compuesto por sales (tampón PBS + 150 mM NaCl), detergente (1 % Triton™ X-100), un cofactor (0.5 % dextrano sulfatado (p/v)) y rec-PrP de la especie considerada. La técnica PMSA fue desarrollada inicialmente para la propagación de priones de topillo rojo [330], aunque gracias a su versatilidad se ha conseguido optimizar para la obtención espontánea de priones recombinantes de otras muchas especies. Se estableció que para una propagación óptima de la PrP del topillo rojo malplegada era necesario una concentración de rec-PrP superior a 1 μ M en el sustrato, siendo ineficientes concentraciones menores [330]. Según el objetivo de la propagación (estudios estructurales, cribado de compuestos, etc.), la concentración de la rec-PrP puede ser modificada. Por otro lado, la creciente experiencia de nuestro laboratorio en la generación espontánea

de priones recombinantes de diferentes especies ha permitido determinar que la eficiencia del proceso de malplegamiento espontáneo aumenta de forma proporcional con el aumento de la concentración de rec-PrP utilizada, alcanzando un límite superior de concentración. Por tanto, es frecuente el uso de sustratos donde la rec-PrP se encuentre en concentraciones aproximadas a 3 – 5 μM . Así, todos estos datos indican que la concentración de rec-PrP juega un papel importante tanto para la correcta propagación de la proteína malplegada como para la generación espontánea de rec-PrP^{res}. Por ello, aumentar la concentración de rec-PrP humana en el sustrato se planteó como una buena estrategia para conseguir una mayor eficiencia del proceso de malplegamiento espontáneo, consiguiendo así obtener rec-PrP^{res} humanas.

En el caso de otras especies, como el topillo rojo, la concentración de rec-PrP en el sustrato no es tan determinante como en el caso de las rec-PrP humanas, ya que presenta mayor propensión al malplegamiento y, por tanto, este proceso puede inducirse con concentraciones más bajas de rec-PrP. Por otro lado, la concentración final de rec-PrP en el sustrato determina el grado de agregación y precipitación de la proteína recombinante durante su diálisis, un proceso clave al que es sometida para inducir su plegamiento nativo tras la eliminación de los agentes desnaturizantes utilizados para su conservación. Por este motivo, siguiendo el protocolo estándar para la elaboración de sustratos en nuestro laboratorio, la concentración de rec-PrP humana en los experimentos anteriores era aproximadamente 2 – 3 μM , partiendo de proteína desnaturizada a 1000 μM . La agregación y precipitación durante la diálisis no es una característica particular de las rec-PrP humanas, sino que se observa en todas las rec-PrP que se manejan en el laboratorio, aunque cada una de ellas muestra diferentes grados de agregación. Esto provoca una pérdida de proteína recombinante que limita la concentración final en el sustrato de PMSA. Con el objetivo de alcanzar mayor concentración de rec-PrP final, se modificó el protocolo de generación de sustratos para determinar si una concentración inicial mayor de rec-PrP se refleja en una mayor concentración final de rec-PrP tras la diálisis. Esto, como se ha indicado anteriormente, podría mejorar el proceso de obtención de un malplegamiento espontáneo de las rec-PrP humanas mediante PMSA. Para ello, diferentes volúmenes de las proteínas recombinantes humanas rec-Hu M129 PrP, rec-Hu V129 PrP, rec-Hu M109I M129 PrP, rec-Hu M109I V129 PrP y la proteína rec-Topillo rojo I109 PrP se concentraron mediante filtros de centrifugación hasta alcanzar una concentración de 2000 μM (2x respecto a la concentración inicial usada normalmente) y 4000 μM (4x respecto a la concentración inicial usada normalmente). Además, también se incluyeron las mismas rec-PrP a una concentración de 1000 μM (1x, concentración inicial del protocolo estándar para la preparación de sustratos). Tras su concentración, todas las rec-PrP se sometieron al proceso de diálisis y centrifugación sin ninguna otra modificación. La concentración final de cada una de las proteínas se midió mediante el ensayo colorimétrico BCA. Cabe destacar que la

concentración medida tras la diálisis es 10 veces mayor que la concentración final en el sustrato, ya que la proteína dializada se diluye 10 veces en solución de conversión, por lo que una concentración de 25 μM tras diálisis supone una concentración de rec-PrP en el sustrato de 2.5 μM . En la Figura 10 se representan los resultados obtenidos para cada rec-PrP, tanto humanas como de topillo rojo. En primer lugar, se observa como la rec-PrP de topillo rojo presenta una mayor concentración final post-diálisis que cualquier rec-PrP humana. La concentración obtenida en la condición 1x para topillo rojo es incluso mayor que la concentración obtenida en la condición 4x con las rec-PrP humanas, salvo en el caso de la rec-Hu M129 PrP. Esto indica que la precipitación de las rec-PrP humanas en diálisis es mayor y aun utilizando una concentración 4 veces mayor de rec-PrP no se puede alcanzar la concentración inicial que se consigue con la rec-PrP de topillo rojo. Además, el comportamiento de todas ellas es similar, ya que se observa que el aumento de 2 o 4 veces la concentración pre-diálisis no provoca un aumento proporcional de concentración post-diálisis. Por último, se observa también que el uso de concentraciones 2x y 4x de la rec-PrP de topillo rojo no provocan un aumento proporcional de la concentración final, sino que se alcanza un límite máximo de concentración a partir del cual la proteína agrega y precipita. Por tanto, podemos concluir que aumentar la concentración inicial de partida, si bien lleva a un aumento de la concentración final, este no es proporcional como consecuencia de una mayor pérdida de proteína por agregación durante la diálisis. Además, la calidad del sustrato final podría estar afectada debido a la presencia de un mayor número de moléculas de rec-PrP agregadas o incorrectamente plegadas. En vista de estos resultados se decidió no seguir explorando esta vía y se seleccionaron otros parámetros para la optimización del proceso.

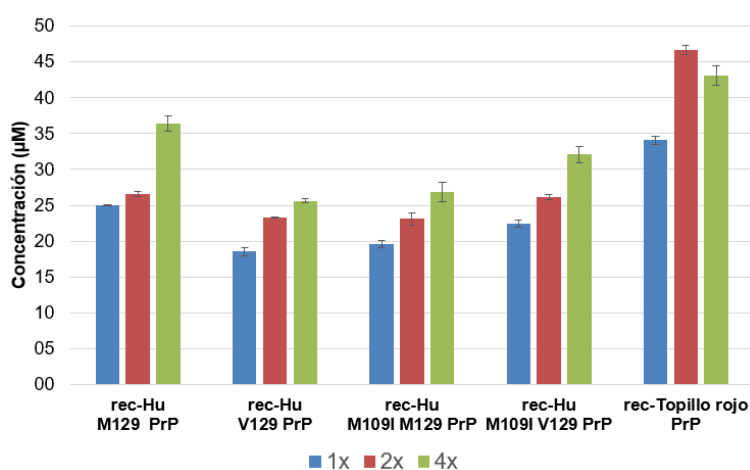


Figura 10. Estudio del efecto de la concentración de PrP recombinantes previa a la diálisis para la obtención de sustratos de PMSA con mayor concentración de proteína soluble. Representación gráfica de la concentración de PrP recombinante humana M129 (rec-Hu M129 PrP), PrP recombinante humana V129 (rec-Hu V129 PrP), PrP recombinante humana M109I M129 (rec-Hu M109I M129 PrP), PrP recombinante humana M109I V129 (rec-Hu M109I V129) y PrP recombinante de topillo rojo I109 (rec-Topillo rojo PrP) utilizada como control, tras diálisis frente a PBS partiendo de las fracciones pre-diálisis sin concentrar (1x) o

concentradas (2x y 4x) mediante filtros de centrifugación. Todas las proteínas recombinantes fueron concentradas hasta 2000 y 4000 μM (2x y 4x con respecto a la concentración pre-diálisis estándar 1x: 1000 μM). Tras el proceso de concentración inicial y posterior diálisis y centrifugación de cada muestra la concentración (μM) de cada una de ellas se obtuvo mediante el kit *BCA protein assay*. En ningún caso se obtuvieron concentraciones de PrP recombinantes post-diálisis proporcionales a la concentración ajustada previamente mediante filtros de centrifugación, observándose una mayor pérdida en diálisis para las PrP humanas respecto a la PrP de topillo rojo en todos los casos. La concentración de cada muestra se midió por triplicado. Los resultados obtenidos con cada PrP recombinante se representan como la concentración media de los triplicados. Las barras de error representan la desviación estándar de cada muestra. 1x (azul): concentración pre-diálisis estándar de 1000 μM ; 2x (rojo): concentración pre-diálisis de 2000 μM ; 4x (verde): concentración pre-diálisis de 4000 μM .

Debido a los resultados anteriores, se decidió modificar las condiciones de diálisis para intentar disminuir el fenómeno de agregación durante dicho proceso. Las modificaciones consistieron en dializar frente a diferentes soluciones de diálisis que contenían PBS y 0.5 M de hidrocloreuro de guanidinio (Gdn-HCl) o una solución de diálisis consistente en 20 mM de acetato de sodio (AcNa) pH 5, utilizado habitualmente en el trabajo con PrP recombinantes [389, 399, 400]. Estas modificaciones no solo no disminuyeron significativamente la agregación sino que tampoco mejoraron la eficiencia de la PMSA a la hora de obtener malplegamientos espontáneos de las rec-PrP humanas. Otro cambio introducido consistió en la adición de un 10 % de glicerol (v/v) en la solución de diálisis. Se sabe que el glicerol aumenta la estabilidad de las proteínas globulares y en general inhibe la agregación proteica durante el proceso de plegamiento nativo de muchas de ellas [390]. Debido a la interferencia del Gdn-HCl y del glicerol con la reacción colorimétrica que tiene lugar en el ensayo de BCA no se pudo cuantificar la concentración final de rec-PrP tras la diálisis, pero no se observó de forma visual una mejora en la agregación y precipitación de las rec-PrP. Los sustratos generados mediante este método se sometieron a rondas de PMSA de igual forma que en los experimentos anteriores y tampoco se observó ninguna mejora en la formación de rec-PrP^{res} de forma espontánea.

Ninguna de las estrategias llevadas a cabo con el fin de disminuir la agregación de las rec-PrP durante su diálisis permitió alcanzar concentraciones mayores de rec-PrP en el sustrato ni mejorar su calidad que incidiera sobre el malplegamiento espontáneo de las rec-PrP humanas. Por otro lado, realizar una dilución mayor de dichas rec-PrP en la solución de conversión no se consideró debido a que una determinada concentración de sales, detergente y cofactor es crucial para el correcto funcionamiento de la técnica. Por todo ello, se decidió seguir elaborando el sustrato mediante el protocolo estándar y explorar otras estrategias con el fin de disminuir la pérdida de proteína recombinante durante todo el proceso de PMSA. Así, otros de los factores que influyen en la pérdida de proteína son los procesos de congelación/descongelación a los que están sometidos los sustratos para su conservación, como consecuencia de la formación inespecífica de agregados. Estos ciclos de congelación y descongelación provocan la desnaturalización y agregación de proteínas [401, 402], lo que supone una pérdida adicional de rec-PrP, así como una disminución de la calidad del sustrato, que dificultaría aún más el proceso de malplegamiento espontáneo de las rec-PrP humanas mediante PMSA. Por ello, para testar el efecto de los ciclos de congelación/descongelación sobre la agregación y, por tanto, sobre la concentración final de rec-PrP, las proteínas humanas y de topillo rojo se sometieron a 5 rondas de congelación/descongelación tras la diálisis, con centrifugación de las muestras para eliminar los posibles agregados que se forman tras cada ronda. Los resultados se midieron mediante ensayo de BCA y se representaron gráficamente en función de las rondas de congelación. La Figura 11 muestra como la concentración tras la diálisis (R0) es superior para la rec-

Topillo rojo I109 PrP, siendo superior a 30 μM , mientras que las rec-PrP humanas se encuentran en un rango de 20 – 30 μM en consonancia con los resultados previos. Las sucesivas rondas de congelación/descongelación provocan la pérdida de proteína recombinante, llegando a una concentración aproximada de 15 μM para todas las rec-PrP humanas, excepto para la rec-Hu M109I V129 PrP, que disminuye hasta una concentración cercana a 20 μM . En términos generales se observa que todas las rec-PrP, incluida la de topillo rojo, se ven afectadas por el proceso de congelación/descongelación, siendo este efecto independiente de la especie de la rec-PrP considerada. Esta disminución observada desde la ronda 1 de descongelación, limitaría aún más el proceso de malplegamiento espontáneo de las rec-PrP humanas, ya que se trata de otra disminución adicional de la concentración de rec-PrP en el sustrato. Por esta razón, para la obtención de priones recombinantes humanos de forma espontánea se decidió trabajar con sustratos recombinantes humanos que no hubieran sido sometidos a un proceso de congelación y descongelación previo. Para trabajar en estas condiciones, los sustratos recombinantes humanos se conservaron a 4°C protegidos de la luz durante un máximo de 24 h. Estos cambios en el manejo de los sustratos recombinantes humanos se establecen como fijos durante todo el desarrollo de esta tesis doctoral, siempre y cuando se utilicen para la obtención de rec-PrP^{res} humanas de forma espontánea.

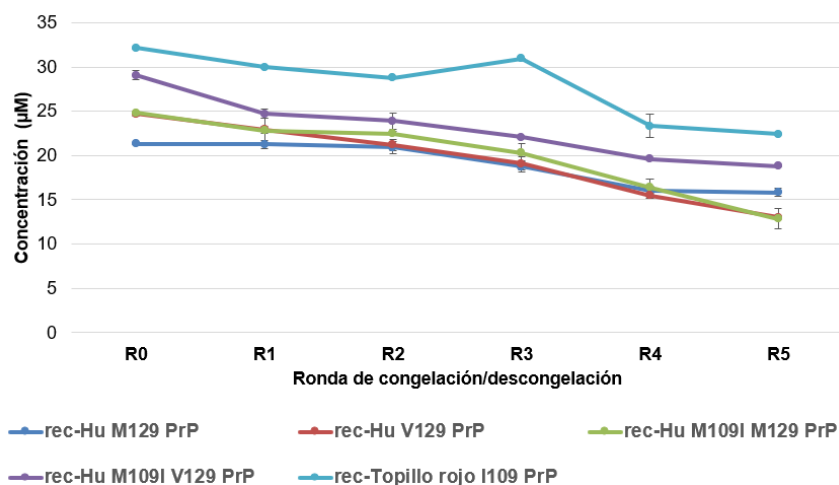


Figura 11. Efecto de los ciclos de congelación/descongelación sobre la concentración final de PrP recombinante soluble. Representación gráfica del efecto de los ciclos de congelación y descongelación sobre la concentración final de las diferentes PrP recombinantes humanas y sobre la PrP recombinante de topillo rojo, usada como control. Tras la diálisis, las proteínas recombinantes fueron sometidas a cinco ciclos sucesivos de congelación/descongelación (R1 – R5). R0 indica la concentración de PrP recombinante tras la diálisis frente a PBS antes de la primera ronda de congelación. Tras cada congelación las muestras, por duplicado, se centrifugaron y se midió la concentración de PrP (μM) en el sobrenadante de cada muestra mediante *BCA protein assay* por triplicado. Los resultados se representan como la concentración media de los duplicados, que muestran pérdidas similares para todas las PrP. Las barras de error representan la desviación estándar de cada muestra. rec-Hu M129 PrP (azul oscuro): PrP recombinante humana M129; rec-Hu V129 PrP (rojo): PrP recombinante humana V129; rec-Hu M109I M129 PrP (verde): PrP recombinante humana M109I M129; rec-Hu M109I V129 PrP (morado): PrP recombinante humana M109I V129; rec-Topillo rojo I109 PrP (azul claro): PrP recombinante de topillo rojo I109.

3.2. Optimización de las partículas esféricas y la velocidad de agitación

Otros de los parámetros que influyen notablemente en la eficiencia tanto de la propagación de proteínas malplegadas como en el malplegamiento espontáneo de las rec-PrP mediante PMSA son el material y el tamaño de las partículas esféricas utilizadas en el sistema. La experiencia con rec-PrP de otras especies en nuestro laboratorio ha permitido determinar que las partículas esféricas de vidrio favorecen, en comparación con otros materiales estudiados, el fenómeno de espontaneidad. Aunque los mecanismos implicados en este fenómeno como la energía de superficie son aún objeto de estudio, los resultados obtenidos con la proteína de topillo rojo sugieren que dentro de un rango, cuanto mayor es la superficie de vidrio, más eficiente es el malplegamiento espontáneo. Las proteínas, debido a su naturaleza anfipática, tienen la capacidad de adsorberse sobre una gran cantidad de materiales, entre ellos el vidrio [403, 404]. Este fenómeno de adsorción sobre las partículas esféricas de vidrio podría provocar el secuestro de moléculas de rec-PrP del sustrato, provocando a su vez una reducción de la concentración efectiva de rec-PrP susceptible a ser malplegada y, por tanto, una disminución significativa de la eficiencia del sistema para inducir el malplegamiento espontáneo. En el caso de las rec-PrP humanas, dada su baja tendencia al malplegamiento espontáneo *in vitro*, esta reducción afectaría fundamentalmente a la eficiencia del sistema, en contraposición con la rec-PrP de topillo rojo, la cual de forma natural presenta una alta tendencia al malplegamiento. Sin embargo, dado que uno de los requerimientos del sistema es la presencia de partículas esféricas de vidrio en el tubo de ensayo, se decidió optimizar la cantidad de las mismas para adecuarla a las rec-PrP humanas. En primer lugar, se estudió el comportamiento de las diferentes rec-PrP humanas en presencia de estas partículas dentro del tubo de ensayo, evaluando su grado de adsorción por unidad de superficie de vidrio y cómo esta influía en la concentración de la proteína final efectiva en el sustrato. El objetivo era encontrar un equilibrio entre la cantidad de partículas esféricas y la concentración de la rec-PrP en el medio. Para ello, se trabajó con distintas cantidades de partículas esféricas de vidrio de 0.1 mm de diámetro que aportaban al sistema distintas superficies: 0, 50, 120, 300, 900, 3200 y 6200 mm². Cabe destacar que en los experimentos anteriores, donde se trató de obtener rec-PrP^{res} humana de forma espontánea mediante el sistema de PMSA adaptado a PrP de roedores, la cantidad de partículas esféricas utilizadas en cada tubo de ensayo contribuía con 2500 – 3000 mm² de superficie de vidrio. Dado que el comportamiento de todas las rec-PrP humanas en los experimentos anteriores fue similar, este experimento se llevó a cabo de forma representativa con las rec-Hu M129 PrP, rec-Hu V129 PrP y rec-Topillo rojo I109 PrP. Las proteínas se incubaron a temperatura ambiente en agitación continua y en presencia de la cantidad de partículas esféricas de vidrio de 0.1 mm que aportaba las correspondientes superficies en estudio. Se tomó una fracción de cada muestra en intervalos de 30 min y se midió la concentración mediante BCA. La concentración inicial de cada proteína fue de 22.2 μM y 20.8 μM para

las rec-Hu M129 PrP y rec-Hu V129 PrP, respectivamente y de 31.25 μM para la rec-Topillo rojo I109 PrP, reflejando esta de nuevo una mayor concentración tras diálisis. En la Figura 12 se puede observar una reducción de la concentración de las rec-PrP en el sobrenadante en función de la superficie de vidrio como consecuencia de la adsorción. Se observa también que la adsorción aumenta con el tiempo, hasta alcanzar un máximo entre los 60 y 90 min, lo que podría deberse a una saturación de la superficie. No se encontraron diferencias significativas entre las rec-PrP humanas y la de topillo rojo (Figura 12 a, b y c). El hecho de observar una disminución de la cantidad de rec-PrP también en ausencia de partículas esféricas de vidrio, sugiere que se debe a su agregación durante el proceso de incubación. Sin embargo, esta disminución es mayor cuando las rec-PrP se incuban en presencia de partículas esféricas de vidrio y es directamente proporcional a la cantidad de superficie utilizada para todas las rec-PrP testadas. Cuando la superficie de vidrio es mayor de 900 mm^2 se produce la pérdida por adsorción de al menos el 50 % de proteína en todos los casos, lo que reduce a la mitad la concentración inicial de rec-PrP soluble en sustrato. Sin embargo, en el caso de las rec-PrP humanas, en presencia de una menor superficie de vidrio, (300 mm^2 o menos), la pérdida por adsorción es menor; el 30 % o menos, dependiendo de la cantidad de superficie. Estos resultados confirman que un número elevado de partículas esféricas de vidrio provoca una reducción significativa de la proteína efectiva en el medio como consecuencia de su adsorción al vidrio dificultando el malplegamiento espontáneo, principalmente el de las rec-PrP humanas. La eficiencia del malplegamiento de la rec-PrP de topillo rojo no se vería tan afectada por esta reducción de concentración debido a su alta propensión al malplegamiento, motivo por el cual es capaz de malplegarse de forma espontánea en presencia de mayor cantidad de partículas esféricas, como las utilizadas previamente en el sistema de PMSA.

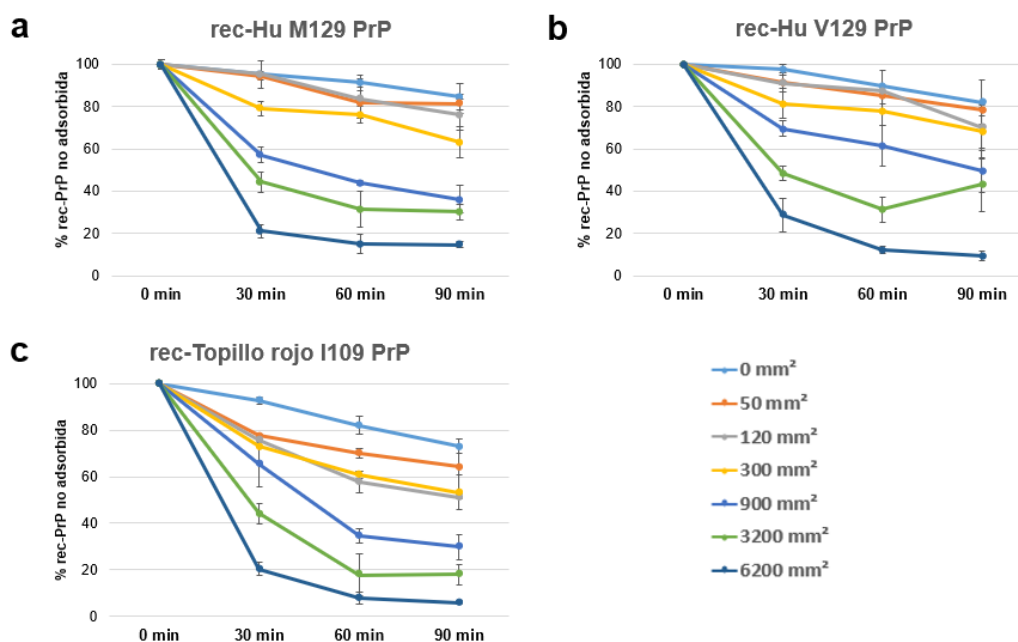


Figura 12. Evaluación del grado de adsorción de las PrP recombinantes humanas y de topillo rojo a la superficie de partículas esféricas de vidrio. Representación gráfica del grado de adsorción por unidad de superficie de las **a)** PrP recombinantes humanas M129 (rec-Hu M129 PrP), **b)** PrP recombinante humana V129 (rec-Hu V129 PrP) y **c)** PrP recombinante de topillo rojo I109 (rec-Topillo rojo I109 PrP). Las proteínas recombinantes tras su diálisis frente a PBS, se incubaron en movimiento constante a temperatura ambiente en presencia de diferentes cantidades de partículas esféricas de vidrio de 0.1 mm de diámetro que aportan 0, 50, 120, 300, 900, 3200 o 6200 mm² de superficie. Tras 30, 60 y 90 min se tomó una fracción de cada muestra y se midió por duplicado la concentración de PrP recombinante (μM) en cada muestra mediante *BCA protein assay*. Los datos se muestran normalizados con respecto a la concentración inicial de PrP a tiempo 0 min de cada muestra (100%) y se representan en función del tiempo de incubación como el porcentaje de PrP recombinante no adsorbida. Se representa la media de los duplicados. Las barras de error indican la desviación estándar de cada muestra. Se observa que cuanto mayor es la superficie de vidrio en el tubo de ensayo menor es el porcentaje de PrP no adsorbida, alcanzando un máximo de adsorción entre los 60 y 90 min para todas las proteínas recombinantes ensayadas y con pérdidas superiores al 60 % de PrP soluble con superficies de vidrio mayores de 900 mm².

Basándonos en los resultados presentados en la Figura 12 se testó el efecto de una determinada cantidad de partículas esféricas de vidrio sobre el malplegamiento espontáneo. El número de partículas se eligió tratando de conseguir una superficie (300 – 500 mm²) tal que permitiera encontrar un equilibrio entre la adsorción y la concentración de proteína efectiva en el medio. El manejo de cantidades reducidas de partículas esféricas de pequeño tamaño dificulta la reproducibilidad del sistema y aumenta los problemas técnicos para la preparación de cada tubo de ensayo, siendo necesario el uso de balanzas de precisión para pesar cantidades de 15 – 20 mg de partículas esféricas de 0.1 mm. Por ello, se utilizaron partículas esféricas de vidrio de 1.0 mm de diámetro, dado que permite conseguir la misma superficie, pero con un manejo más fácil debido a su mayor tamaño y peso. Una superficie de 300 – 500 mm² se corresponden con 150 – 250 mg de partículas esféricas de vidrio de 1.0 mm, aproximadamente. A lo largo de este experimento donde se fijó la superficie de vidrio utilizada a 400 mm² mediante el uso de partículas de 1.0 mm de diámetro, se estudió el efecto de diferentes velocidades de agitación sobre el malplegamiento espontáneo. Se emplearon 500, 700 y

1000 rpm, siendo 1000 rpm la velocidad de agitación empleada habitualmente en PMSA con rec-PrP de roedores. Se llevaron a cabo dos rondas de PMSA seriadas de 24 h con los sustratos rec-Hu M129 PrP, rec-Hu V129 PrP, rec-Hu M109I M129 PrP y rec-Hu M109I V129 PrP, en ausencia de semilla. Para la segunda ronda seriada de PMSA, el producto de la primera ronda se diluyó en sustrato fresco 1:10 y se sometió al mismo proceso. Los productos obtenidos de cada ronda de PMSA se digirieron con PK y los resultados se obtuvieron a través de la tinción de proteína total resistente a la proteasa. El número de rondas utilizado se basó en la experiencia previa con rec-PrP de otras especies, donde se consigue consistentemente el malplegamiento espontáneo en una sola ronda de PMSA. La aplicación de un número alto de rondas tiene la desventaja potencial de generar material resistente a proteasas heterogéneo. En la Figura 13 se muestran los resultados obtenidos con las nuevas condiciones de PMSA donde se observa como una menor superficie, conseguida tras el uso de partículas esféricas de vidrio de mayor tamaño, favorece el malplegamiento espontáneo de las rec-PrP humanas WT. Es en este experimento donde se obtuvo por primera vez material resistente a PK con estas proteínas. Todas las velocidades de agitación favorecieron el malplegamiento espontáneo, aunque se observó una mayor frecuencia cuando se utilizaron velocidades de agitación menores de 1000 rpm. Se alcanzó una eficiencia de casi el 100 % en la ronda 2 con los sustratos rec-Hu M129 PrP y rec-Hu V129 PrP agitados a 500 y 700 rpm. La eficiencia de obtención de rec-PrP^{res} espontánea en la ronda 1 fue del 25 % y del 75 % en la ronda 2 para las dos variantes WT. Con estas nuevas condiciones, la eficiencia del malplegamiento espontáneo de las rec-Hu M109I M129 PrP y rec-Hu M109I V129 PrP fue menor en comparación con las rec-PrP humanas WT. En el caso de la rec-Hu M109I V129 PrP, la eficiencia del malplegamiento espontáneo fue menor también en comparación con los resultados previos, donde se obtuvo el 100 % de eficiencia en la ronda 2 de PMSA. Esta aparentemente menor eficiencia del malplegamiento de las rec-PrP humanas con la mutación M109I en comparación con las rec-PrP humanas WT y teniendo en cuenta los resultados previos, podría ser reflejo de la estocasticidad del proceso de malplegamiento espontáneo, que puede hacer variar la obtención de rec-PrP malplegada en una o dos rondas de PMSA. Sin embargo, el malplegamiento espontáneo observado por primera vez con las rec-PrP humanas WT confirma el éxito de optimización del sistema. Por todo ello se concluye que una adecuada superficie de vidrio y una ajustada velocidad de agitación aumentan la eficiencia de la PMSA, siendo esta capaz de promover el malplegamiento espontáneo de las rec-PrP humanas WT, con una eficiencia en torno al 25 % en la ronda 1 y cercana al 100 % en la ronda 2 (Figura 13).

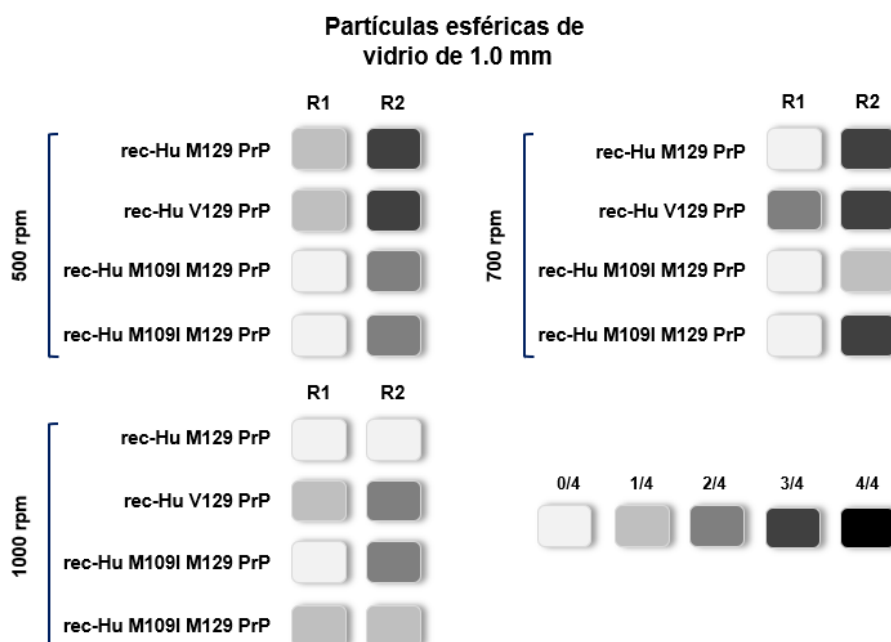


Figura 13. Estudio de la capacidad de malplegamiento espontáneo de las PrP recombinantes humanas a diferentes velocidades de agitación utilizando partículas esféricas de vidrio con superficie óptima. Representación gráfica de la generación de PrP recombinante malplegada (rec-PrP^{res}) de forma espontánea (sin semilla priónica) mediante la utilización de partículas esféricas de vidrio de 1.0 mm de diámetro que aportan 400 mm² de superficie de vidrio y 500 rpm (panel superior izquierdo), 700 rpm (panel superior derecho) y 1000 rpm (panel inferior izquierdo) como velocidades de agitación. Los sustratos con PrP recombinante humana M129 (rec-Hu M129 PrP), PrP recombinante humana V129 (rec-Hu V129 PrP), PrP recombinante humana M109I M129 (rec-Hu M109I M129 PrP) y PrP recombinante humana M109I V129 (rec-Hu M109I V129 PrP) fueron sometidos a dos rondas seriadas (R1 – R2) de PMSA a dilución 1:10 y se evaluó la presencia de rec-PrP^{res} mediante la digestión con 25 µg/ml de proteinasa K (PK), electroforesis y tinción de proteína total del producto de cada ronda de PMSA. La capacidad de cada sustrato de malplegarse de forma espontánea se ensayó por cuadruplicado. El número de tubos con rec-PrP^{res} detectable tras cada ronda de PMSA se ha señalado con distintas intensidades de gris, tal y como se indica en la leyenda situada en la parte inferior de la figura. Las velocidades de agitación de 500 y 700 rpm son las que más favorecieron el malplegamiento de todas las PrP recombinantes evaluadas, obteniéndose en ambos casos mayor porcentaje de réplicas con rec-PrP^{res} en dos rondas de PMSA que con 1000 rpm.

4. Aplicación del sistema de PMSA adaptado para la obtención de cepas recombinantes humanas espontáneas

Una vez optimizados los parámetros que permitieron por primera vez el malplegamiento espontáneo de diferentes rec-PrP humanas, se testó la reproducibilidad y robustez del nuevo sistema de PMSA adaptado a humanos. Las modificaciones han consistido en 1) evitar la congelación y descongelación de los sustratos, previniendo la formación de agregados que disminuyan tanto la concentración de rec-PrP como la calidad del sustrato por la presencia de agregados amorfos, 2) disminuir la superficie de vidrio mediante partículas esféricas de mayor tamaño y 3) disminuir la velocidad de agitación, que se estableció en 700 rpm ya que no existían diferencias significativas con 500 rpm y además se trata de una velocidad de agitación usada para otras especies. Por ello, se llevó a cabo un nuevo experimento de malplegamiento espontáneo mediante PMSA adaptada a la PrP humana. Se realizaron dos rondas seriadas de PMSA de 24 h en presencia de partículas esféricas de

vidrio de 1.0 mm y 700 rpm. Para la segunda ronda seriada, el material de la ronda previa se diluyó 1:10 en sustrato fresco. Se realizaron cuatro réplicas independientes del mismo experimento y se evaluó la presencia de material resistente a PK. Los resultados muestran que las nuevas condiciones inducen consistentemente el malplegamiento espontáneo de las rec-PrP humanas WT, dado que se obtuvo rec-PrP^{res} humana en la primera ronda de PMSA en un 50 % o más de los tubos, y en la segunda ronda el 100 % de las réplicas muestran material resistente PK (Figura 14 a). En el caso de las rec-PrP humanas con la sustitución M109I también se obtuvo material resistente a PK con la eficiencia esperada, lo que es reflejo de la variabilidad intrínseca del proceso de malplegamiento espontáneo. En el caso de la rec-Hu M109I M129 PrP no se obtuvo rec-PrP^{res} en la ronda 1 en ninguno de los tubos, pero sí se obtuvo en el 75 % de los tubos en la ronda 2. Por el contrario, la rec-Hu M109I V129 PrP presentó una eficiencia de formación de rec-PrP^{res} del 50 % en la ronda 1 y del 100 % en la ronda 2 (Figura 14 a). Estos resultados confirman que las nuevas condiciones han permitido adecuar el sistema de PMSA aumentando su robustez y reproducibilidad para la obtención de rec-PrP^{res} humana de forma espontánea.

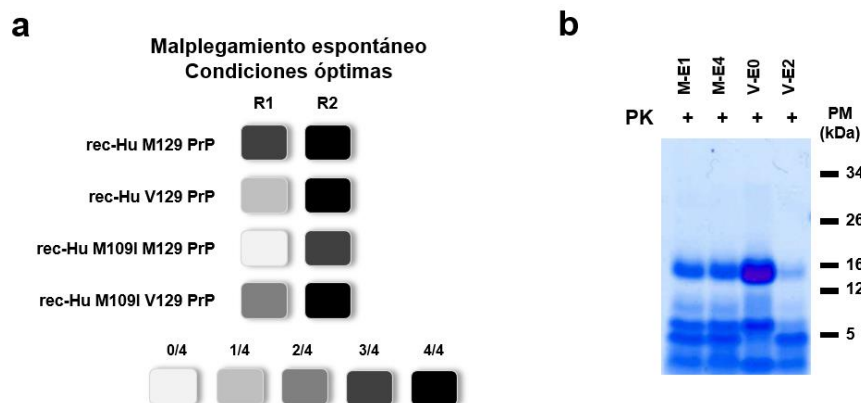


Figura 14. Malplegamiento espontáneo de las PrP recombinantes humanas mediante el sistema de PMSA adaptado a PrP recombinante humana. a) Representación gráfica de la generación de PrP malplegadas (rec-PrP^{res}) humanas de forma espontánea (sin semilla priónica) mediante la aplicación de los parámetros de PMSA que favorecen el malplegamiento de las PrP recombinantes humanas de forma espontánea. Los sustratos basados en PrP recombinante humana M129 (rec-Hu M129 PrP), PrP recombinante humana V129 (rec-Hu V129 PrP), PrP recombinante humana M109I M129 (rec-Hu M109I M129 PrP) y PrP recombinante humana M109I V129 (rec-Hu M109I V129 PrP) fueron sometidos a dos rondas seriadas (R1 – R2) de PMSA a dilución 1:10 y se evaluó la generación de rec-PrP^{res} mediante la digestión con 25 µg/ml de proteinasa K (PK), electroforesis y tinción de proteína total del producto de cada ronda de PMSA. La capacidad de cada PrP de malplegar de forma espontánea se ensayó por cuadruplicado. El número de tubos con rec-PrP^{res} detectable tras cada ronda de PMSA se ha señalado con distintas intensidades de gris, tal y como se indica en la leyenda situada en la parte inferior de la figura. Todas salvo la rec-Hu M109I M129 PrP pudieron malplegar en una sola ronda de PMSA y alcanzaron el 100 % de muestras malplegadas en la segunda ronda, en la que también se observó proteína malplegada para la rec-Hu M109I M129 PrP en el 75 % de las muestras. **b)** Electroforesis y tinción de proteína total de las cuatro rec-PrP^{res} humanas espontáneas seleccionadas para su posterior caracterización bioquímica y aplicación para la búsqueda de compuestos anti-priónicos. Se seleccionaron dos PrP malplegadas humanas M129 (M-E1 y M-E4) y dos PrP malplegadas humanas V129 (V-E0 y V-E2), todas obtenidas en ronda 2 de PMSA. El producto de la ronda 2 de PMSA correspondiente a cada una de ellas se digirió con 25 µg/ml de PK y se evaluó la presencia de rec-PrP^{res} mediante electroforesis y tinción de proteína total. Se observa el patrón de bandas electroforético de cada PrP malplegada seleccionada, siendo similares los de las rec-PrP^{res} M-E1 y M-E4 dado que representan el patrón de bandas mayoritariamente obtenido en todas las réplicas realizadas. Por el contrario, las rec-PrP^{res} V-E0 y V-E2 presentan un patrón de bandas electroforético diferente, con la V-E0 con una banda de ~16 kDa prominente y una banda de ~16 kDa más tenue para la V-E2, ambas representativas de la variedad de PrP malplegadas obtenidas para esta proteína. PM: marcador de peso molecular.

El estudio del patrón electroforético de bandas tras la digestión con PK de todas las réplicas mostró algunas diferencias que sugerían la existencia de distintas conformaciones. Por ello, se seleccionaron dos rec-PrP^{res} de cada variante polimórfica WT para su posterior caracterización y aplicación en la búsqueda de compuestos anti-priónicos (Figura 14 b). Las dos rec-PrP^{res} espontáneas M129 seleccionadas, denominadas M-E1 y M-E4, reflejan el patrón electroforético mayoritario obtenido en las réplicas realizadas con este sustrato, con una banda resistente de ~16 kDa y fragmentos resistentes de bajo peso molecular. En el caso de las rec-PrP^{res} espontáneas V129, se seleccionaron de igual forma dos rec-PrP^{res}, las cuales muestran un patrón electroforético diferente, pero son representativas de la limitada variedad de patrones electroforéticos obtenidos con este polimorfismo. La rec-PrP^{res} denominada V-E0 presenta un patrón electroforético caracterizado por una banda de ~16 kDa prominente y un menor número de fragmentos de bajo peso molecular. Este tipo de patrón se observó también en otras muestras de rec-PrP^{res} que presentaban este mismo polimorfismo pero no fue el mayoritario. La rec-PrP^{res} denominada V-E2 presenta por el contrario una banda de ~16 kDa resistente a PK más tenue, siendo representativa de todas las rec-PrP^{res} obtenidas con este polimorfismo y más frecuente que la V-E0 (Figura 14 b). Estas proteínas malplegadas que portaban ambos polimorfismos (M129 y V129) se seleccionaron por sus distintivos patrones electroforéticos y se estudiaron en profundidad para determinar si alguna de ellas presentaba alguna característica diferencial que le otorgase propiedades idóneas (mayor capacidad de propagación, infectividad *in vivo*, etc.) para el cribado de compuestos. Las rec-PrP^{res} humanas con la mutación M109I se descartaron durante el proceso de caracterización, al tratarse de proteínas no naturales que mostraron una mayor variabilidad en la eficiencia del malplegamiento espontáneo tras el uso de las nuevas condiciones de PMSA. Cabe destacar que la selección de estas rec-PrP^{res} para su caracterización y para el desarrollo posterior de un sistema de cribado de compuestos basado en priones recombinantes humanos se realizó basándose en la selección de un patrón electroforético similar a los priones recombinantes *bona fide* obtenidos con proteínas de otras especies. En un futuro, se podrán incluir otras rec-PrP^{res} que reúnan características de interés con el fin de aumentar el panel de priones recombinantes humanos a utilizar en la búsqueda de compuestos anti-priónicos mediante el sistema que se desarrolle. La selección de cuatro cepas y no un número mayor de ellas responde a fines prácticos, dado que basándose en el único criterio de selección existente en esta etapa, son representativas de la variabilidad de las rec-PrP^{res} obtenidas hasta el momento.

5. Caracterización de las rec-PrP^{res} recombinantes humanas generadas

Una vez seleccionadas las rec-PrP^{res} humanas M-E1, M-E4, V-E0 y V-E2 se procedió a su caracterización para determinar si presentaban las propiedades necesarias para definir las como priones recombinantes *bona fide* y para adaptarlas a su uso en el cribado masivo de compuestos anti-priónicos mediante PMSA.

5.1. Ensayo de resistencia a PK

Dado que la resistencia a la digestión por proteasas es una de las características principales de los priones *bona fide*, cantidades similares de las cuatro rec-PrP^{res} humanas previamente seleccionadas se sometieron a distintas concentraciones (1, 5, 10, 25 y 50 µg/ml) de PK y su resistencia diferencial a esta proteasa se visualizó través de una tinción de proteínas totales. Los resultados indicaron que las cuatro proteínas malplegadas presentan una alta resistencia a PK, observada a través de la persistencia de la banda de ~16 kDa con la mayoría de los ratios de PK:proteína utilizados. Mientras que la cepa más resistente es la V-E0, las cepas M-E1 y M-E4 presentan una resistencia intermedia, siendo la menos resistente de todas ellas la V-E2. En términos generales, las cuatro rec-PrP^{res} humanas generadas de forma espontánea presentan una alta resistencia a PK, aunque en diferente grado (Figura 15 a).

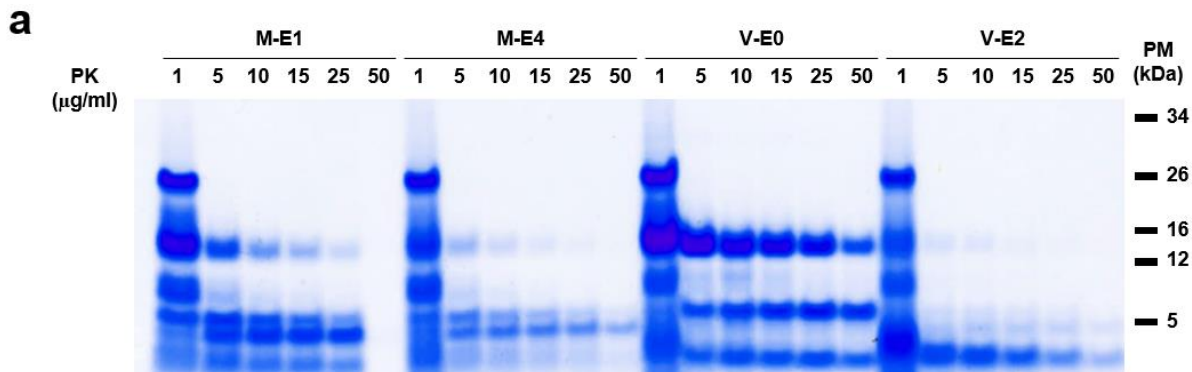


Figura 15. Evaluación de la resistencia a la digestión por proteasas de las semillas recombinantes humanas obtenidas. Electroforesis y tinción de proteína total donde se muestra la capacidad de resistir concentraciones crecientes de proteasas K (PK) de las PrP recombinantes malplegadas (rec-PrP^{res}) humanas obtenidas de forma espontánea mediante PMSA. Cada semilla fue digerida en las mismas condiciones con 1, 5, 10, 15, 25 o 50 µg/ml de PK. Para todas las semillas se observa una digestión incompleta a concentraciones mínimas de PK (1 µg/ml), siendo la banda electroforética de ~ 26 kDa la proteína recombinante humana sin digerir. Todas las semillas presentan gran resistencia a la digestión con PK, siendo la menos resistente la semilla V-E2 y la más resistente la V-E0, cuyo fragmento de ~ 16 kDa resiste hasta 50 µg/ml de PK. PM: marcador de peso molecular.

5.2. Capacidad de propagación mediante diluciones seriadas por PMSA

En segundo lugar, se llevó a cabo la caracterización de las rec-PrP^{res} humanas a través de la evaluación de su eficiencia de propagación utilizando diluciones seriadas tras someterla a una ronda de PMSA de 24 h. La capacidad de propagación se cuantificó basándose en la dilución máxima de la

semilla en la que se observó propagación mediante la detección de proteína resistente tras la digestión con PK [405]. La capacidad de propagarse indefinidamente es una característica fundamental de los priones *bona fide* que resulta clave para el desarrollo de un sistema de búsqueda de compuestos anti-priónicos basado en diluciones seriadas. Esta capacidad permite detectar inhibidores de la propagación priónica atendiendo a la máxima dilución de la semilla donde se detecta rec-PrP^{res} en comparación con la dilución máxima del control, al que no se añade el compuesto objeto de estudio. Así, el uso de una proteína malplegada *bona fide* con una alta eficiencia de propagación tras su dilución seriada permitiría observar mayores variaciones entre compuestos sin capacidad de inhibición, con baja capacidad y con alta capacidad de inhibición. Además, reduciría la posibilidad de falsos positivos al aumentar el margen de detección de inhibidores y establecer umbrales mínimos de detección, considerando inhibidores, por ejemplo, solo aquellos compuestos que reduzcan 1000 veces o más la eficiencia de propagación.

En una primera fase, se evaluó la eficiencia de propagación de cada rec-PrP^{res} mediante PMSA utilizando 1000 rpm como velocidad de agitación basándose en los resultados obtenidos previamente con priones recombinantes de otras especies [330]. Para ello, cada rec-PrP^{res} humana seleccionada se sometió a diluciones seriadas 1:10: 1:10¹, 1:10²; 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵, 1:10⁶, 1:10⁷ y 1:10⁸. Tras una ronda de 24 h de PMSA utilizando 1000 rpm y en presencia de partículas esféricas de zirconio-sílice de 1.0 mm, se comprobaron los niveles de propagación mediante digestión con PK y tinción de proteínas totales. La tinción mostró que únicamente la semilla V-E0 fue capaz de propagar hasta la dilución 1:10⁴, mientras que las demás no fueron capaces de propagar ni siquiera en la dilución 1:10¹ (Figura 16 b). Además, en las diluciones seriadas con la semilla V-E2, donde no se obtuvo propagación, se observó fragmentos resistentes a PK de bajo peso molecular, similares a los observados en los experimentos donde se utilizaron semillas de origen encefálico. Estos resultados sugerían que los parámetros para permitir la propagación seriada de las semillas recombinantes humanas no eran los idóneos, al igual que para el malplegamiento espontáneo de las rec-PrP humanas. Por ello, se llevó a cabo el mismo experimento descrito anteriormente pero con una velocidad de agitación de 700 rpm (Figura 16 a y b). A esta velocidad de agitación las cuatro semillas recombinantes humanas fueron capaces de propagarse tras su dilución seriada con eficiencias similares. La rec-PrP^{res} M-E1, la V-E0 y la V-E2 fueron capaces de propagarse tras su dilución de 1:10⁸, mientras que la semillas M-E4 lo hizo hasta un máximo de dilución de 1:10⁷ (Figura 16 a). En términos generales, las proteínas malplegadas no mostraron diferencias significativas en relación a su capacidad de propagación tras su dilución seriada. Estos experimentos han permitido concluir que una velocidad de agitación de 1000 rpm impide o limita la propagación de las semillas recombinantes humanas en estudio, mientras que una velocidad de 700 rpm permite la propagación eficiente de todas ellas, de forma similar a los resultados obtenidos para el malplegamiento espontáneo, para el cual fueron más eficientes las velocidades de

agitación de 700 rpm y 500 rpm. Por último, los resultados nos indican que las cuatro rec-PrP^{res} humanas generadas espontáneamente presentan una buena ventana de propagación, una característica muy adecuada para el cribado de compuestos dado que permitirá detectar compuestos con alta, baja o nula capacidad de inhibición, además de facilitar la discriminación de los posibles falsos positivos.

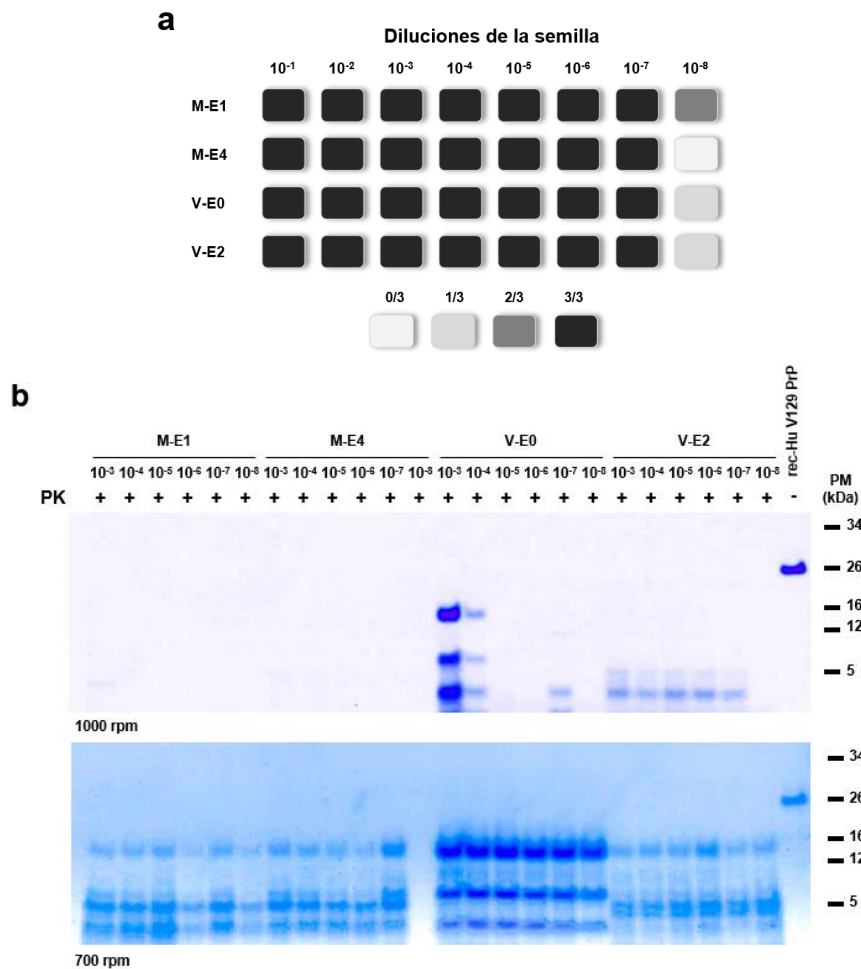


Figura 16. Estudio de la capacidad de propagación por PMSA en diluciones seriadas a diferentes velocidades de agitación de las PrP recombinantes humanas malplegadas M-E1, M-E4, V-E0 y V-E2. a) Representación gráfica de la dilución máxima hasta la cual fue capaz de propagar cada una de las PrP malplegadas (rec-PrP^{res}) humanas seleccionadas. Las semillas se diluyeron $1:10^1 - 1:10^8$ y se sometieron, en presencia de partículas esféricas de zirconio – sílice de 1.0 mm, a una ronda de PMSA de 24 h a 700 rpm. La evaluación de la presencia de rec-PrP^{res} se llevó a cabo mediante la digestión con 25 $\mu\text{g/ml}$ de proteínasa K (PK), electroforesis y tinción de proteína total del producto de cada dilución tras la ronda de PMSA. Cada dilución se ensayó por triplicado. El número de tubos con rec-PrP^{res} detectable tras la ronda de PMSA se ha señalado con distintas intensidades de gris, tal y como se indica en la leyenda situada en la parte inferior de la figura. Se observa que a 700 rpm las cuatro rec-PrP^{res} seleccionadas presentan una gran eficiencia de propagación en diluciones seriadas. Las cuatro semillas recombinantes humanas son capaces de propagar hasta la dilución $1:10^8$ en alguna de las réplicas en las condiciones utilizadas, presentando menor capacidad la semilla M-E4 que alcanza la dilución $1:10^7$. **b)** Electroforesis y tinción de proteína total representativa de los productos de PMSA obtenidos tras la dilución seriada ($1:10^1 - 1:10^8$) de las semillas recombinantes humanas sometidas, en presencia de partículas esféricas de zirconio – sílice de 1.0 mm, a una ronda de PMSA de 24 h a 1000 rpm (imagen superior) o 700 rpm (imagen inferior) y digeridos con PK (25 $\mu\text{g/ml}$). La velocidad de agitación más efectiva fue 700 rpm que permitió la propagación de todas las semillas hasta diluciones de $1:10^7 - 1:10^8$, mientras que a 1000 rpm solo la semilla V-E0 fue capaz de propagar, alcanzando una dilución máxima menor ($1:10^4$). Se observa la generación de fragmentos de bajo peso molecular (≤ 5 kDa) en aquellas diluciones donde no se han propagado las semillas V-E0 y V-E2. rec-Hu V129 PrP: sustrato recombinante humano V129 sin digerir; PM: marcador de peso molecular.

5.3. Comparativa entre las proteínas malplegadas producidas por PMSA y otros agregados de rec-PrP

Durante estos últimos años se han desarrollado diferentes metodologías enfocadas en la generación de fibras amiloides de rec-PrP. Las diferencias entre ellas estriban principalmente en el tipo de agente desnaturizante y/o caotrópico que utilizan [406]. Si bien estos procedimientos son eficientes generando agregados amiloides, estos presentan una infectividad limitada cuando se inoculan en animales [96]. Este hecho sugiere que el amiloide generado utilizando estas técnicas, a pesar de estar compuesto enteramente por rec-PrP malplegada, debe presentar una estructura diferente a la de los priones de interés.

Con el objetivo de dejar patente las diferencias entre las rec-PrP^{res} humanas obtenidas por PMSA y otros agregados fibrilares y/o amorfos de rec-PrP, se generaron tres tipos diferentes de estructuras formadas principalmente por rec-PrP humana y se compararon entre ellas utilizando varias de las propiedades inherentes a los priones: resistencia a proteasas y capacidad de auto-propagación.

Las fibras amiloides estándar se prepararon en presencia del agente caotrópico Gdn-HCl siguiendo el protocolo previamente descrito por Breydo *et al.* y Torrent *et al.* [389, 391] e introduciendo pequeñas modificaciones. El material malplegado de forma desordenada que se denominará agregado amorfo, se preparó a través de una ronda de PMSA sin ningún tipo de partículas esféricas que promoviera la formación de rec-PrP^{res} (ver Materiales y métodos). Las fibras obtenidas en presencia de Gdn-HCl se denominaron human-Gdn-M-E1 y human-Gdn-M-E2 (formadas a partir del sustrato rec-Hu M129 PrP) y human-Gdn-V-E1 y human-Gdn-V-E2 (formadas a partir del sustrato rec-Hu V129 PrP). Las muestras obtenidas mediante PMSA sin partículas esféricas se denominaron agregados-M-E1 (sustrato rec-Hu M129 PrP) y agregados-V-E1 (sustrato rec-Hu V129 PrP). Cabe destacar que para la generación de las fibras Gdn se requirió agitar el sustrato a 30 rpm durante 30 días y para la generación de los agregados amorfos se necesitó de una única ronda de PMSA a 1000 rpm durante 7 días. Ambos procedimientos, comparados con la alta eficiencia de la PMSA, sugieren una baja eficiencia en la inducción del malplegamiento de las rec-PrP humanas.

Una vez generados los tres tipos de agregados de rec-PrP, se procedió a la tinción de proteína total tanto de la fracción completa de cada muestra (es decir, el producto obtenido directamente en cada técnica) como de la fracción precipitada tras centrifugar un volumen determinado de cada muestra. Ambos tipos de fracciones se analizaron inicialmente sin previa digestión con PK, con el fin de evaluar la capacidad de generación de agregados precipitables de cada metodología. Este procedimiento además permitía conocer la cantidad de rec-PrP agregada frente a la de rec-PrP total utilizada en cada reacción, para poder igualar posteriormente el material de partida de cada tipo de agregado en los

sucesivos estudios. La Figura 17 a y b muestra que el total de rec-PrP, independientemente del tipo de metodología usada, precipita tras la centrifugación, ya que la señal de ambas fracciones (total y precipitada) es similar. Esto indica que se ha alcanzado prácticamente el 100 % de agregación de la rec-PrP humana con las tres metodologías. Además, la Figura 17 a y b también muestra que la cantidad de rec-PrP de las fibras Gdn de ambos polimorfismos es aproximadamente 8 veces más que la cantidad correspondiente al material de PMSA y al material amorfo. Esto se debe a que el protocolo de obtención de fibras Gdn requiere de una concentración de rec-PrP 8 – 10 veces mayor de lo que requieren las otras dos técnicas (20 μ M frente a 2-3 μ M de rec-PrP en el sustrato). En la figura se muestra la tinción de proteína total de únicamente una de las muestras de cada polimorfismo obtenida en cada técnica (es decir, M-E1, human-Gdn-M-E1, V-E0 y human-Gdn-V-E1), ya que los resultados obtenidos son representativos de los obtenidos para todas las muestras. Por tanto, según estos resultados y con el objetivo de trabajar con la misma cantidad de material en cada tipo de muestra con fines comparativos, las muestras human-Gdn-M-E1, human-Gdn-M-E2, human-Gdn-V-E1 y human-Gdn-V-E2 se diluyeron 1:8 en PBS. La Figura 18 muestra que, una vez diluidas, todas las muestras presentaban cantidades similares de proteína malplegada. El estudio comparativo de cada una de estas proteínas se realizó a través de la cuantificación de 1) la presencia de estructuras basadas en láminas beta, 2) la resistencia a proteasas y 3) la capacidad de propagar su malplegamiento a otras moléculas de rec-PrP por PMSA, una técnica que ha demostrado una alta eficiencia propagando priones recombinantes *bona fide* [330].

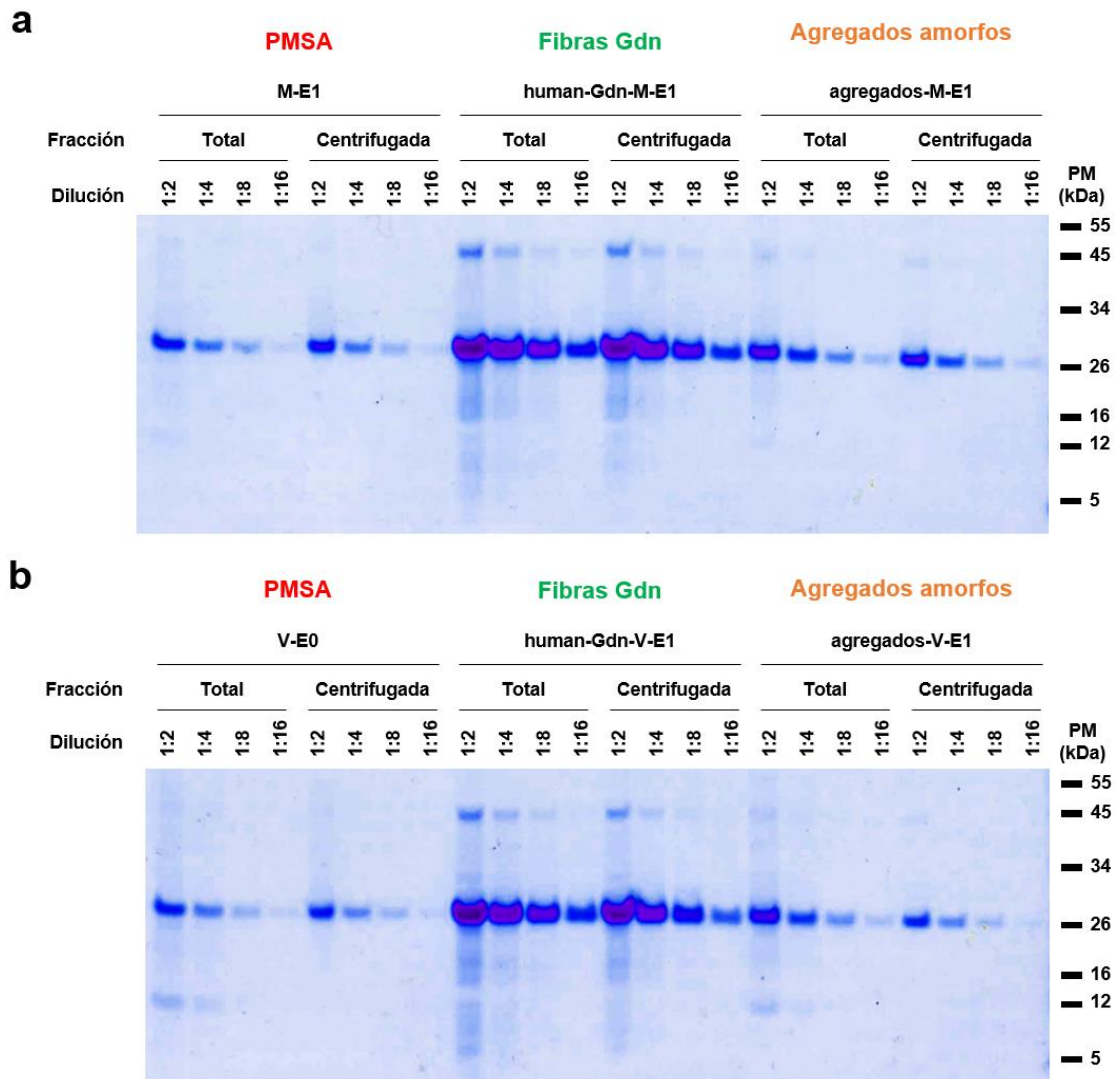


Figura 17. Estudio comparativo de la PrP total y PrP agregada o precipitable de los productos de PMSA, fibras Gdn y agregados amorfos obtenidos mediante diferentes técnicas. Electroforesis y tinción de proteína total de la fracción total (rec-PrP total, tanto soluble como agregada) y de la fracción centrifugada (rec-PrP agregada o precipitable obtenida tras la centrifugación de un volumen determinado del producto de cada técnica) de la **a**) PrP malplegada M-E1 (PMSA), de la muestra human-Gdn-M-E1 (obtenida con sustrato recombinante humano M129 con 2M de hidrocloreto de guanidinio y agitación de 30 rpm a 39 °C durante 30 días) (Fibras Gdn) y de la muestra agregados-M-E1 (obtenida con sustrato recombinante humano M129 tras la agitación a 1000 rpm y 39 °C sin partículas esféricas durante 7 días) (Agregados amorfos) y **b**) de la PrP malplegada V-E0 (PMSA), de la muestra human-Gdn-V-E1 (obtenida igual que la muestra human-Gdn-M-E1 pero con sustrato recombinante humano V129) (Fibras Gdn) y de la muestra agregados-V-E1 (obtenida igual que la muestra agregados-M-E1 pero con sustrato recombinante humano V129) (Agregados amorfos). Los productos obtenidos directamente de cada técnica se diluyeron de forma seriada en PBS (1:2, 1:4, 1:8 y 1:16) con fines comparativos (fracción total). Un volumen adecuado de cada producto se centrifugó a 19 000 g durante 15 min a 4 °C y el material precipitado se resuspendió en el mismo volumen de PBS y posteriormente se diluyó de forma seriada (1:2, 1:4, 1:8 y 1:16) con fines comparativos (fracción centrifugada). Se observa que prácticamente toda la PrP recombinante (rec-PrP) de cada sustrato utilizado, independientemente de la técnica, precipita tras la centrifugación, dado que la señal de ambas fracciones (total y centrifugada) son similares, indicando que se alcanza aproximadamente el 100% de malplegamiento o agregación de la proteína recombinante humana con las tres técnicas utilizadas. También se observa que la cantidad de rec-PrP total de las fibras Gdn de ambos polimorfismos (human-Gdn-M-E1 y human-Gdn-V-E1) es aproximadamente 8 veces mayor en comparación con la cantidad de rec-PrP en el material de PMSA (M-E1 y V-E0) y el material agregado amorfo (agregados-M-E1 y agregados-V-E1), lo que viene dictado por las condiciones en las que debía llevarse a cabo cada uno de los tres métodos empleados. PM: marcador de peso molecular.

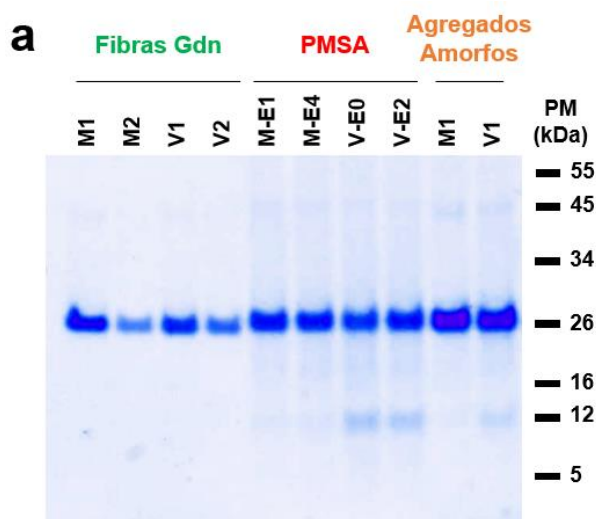


Figura 18. Equiparación de la cantidad de PrP recombinante de los productos obtenidos mediante las tres técnicas utilizadas para la formación de diferentes agregados de PrP recombinantes humanas para estudios comparativos posteriores. Electroforesis y tinción de proteína total de cada una de los productos de las tres metodologías utilizadas para el malplegamiento de rec-PrP tras igualar la cantidad de proteína recombinante de cada uno de ellos mediante dilución 1:8 en PBS de las Fibras Gdn. Estos productos que presentan cantidades similares de PrP recombinante (rec-PrP) humana han sido utilizados para los estudios comparativos posteriores, realizados con el objetivo de diferenciar las semillas de PMSA del material obtenido mediante las otras dos técnicas. Fibras Gdn M1, M2, V1 y V2: material agregado obtenido tras la agitación de sustratos recombinantes humanos M129 (M1 y M2) y V129 (V1 y V2) con 2 M de hidrocloreuro de guanidinio a 30 rpm y 39 °C durante 30 días; PMSA: PrP recombinante humana malplegada M-E1, M-E4, V-E0 y V-E2 obtenidas de forma

espontánea en PMSA; Agregados amorfos M1 y V1: material agregado de forma desordenada mediante la agitación de sustratos recombinantes humanos M129 (M1) y V129 (V1) a 1000 rpm y 39 °C sin partículas esféricas durante 7 días. PM: marcador de peso molecular.

La presencia de estructuras basadas en láminas beta y, por extensión, de fibras amiloides se llevó a cabo utilizando espectrometría y tioflavina T (ThT), cuya intercalación en las láminas beta provoca un aumento de la intensidad de su fluorescencia que es directamente proporcional a la cantidad de este tipo de estructuras que contiene la muestra [407]. Cada muestra, por triplicado, se diluyó 1:5 en la solución de medición que contenía 22 μ M de ThT y se midió utilizando un fluorímetro. Como control de la autofluorescencia de la ThT en ausencia de fibras amiloides, se incluyeron ocho muestras de sustrato recombinante humano no sometidos a ningún proceso de agitación o formación de agregados. Los resultados indican que las muestras de rec-PrP^{res} obtenidas por PMSA (M-E1, M-E4, V-E0 y V-E2) contienen una mayor cantidad de fibras amiloides en comparación con las fibras Gdn (human-Gdn-M-E1, human-Gdn-M-E2, human-Gdn-V-E1 y human-Gdn-V-E2) y las muestras que contienen el material amorfo (agregados-M-E1 y agregados-V-E1) (Figura 19). Dentro de las muestras de rec-PrP^{res} humanas obtenidas por PMSA, la V-E2 es la que contiene una menor cantidad de estructuras basadas en lámina beta, siendo similar en las otras tres muestras. Por el contrario, tanto las muestras obtenidas en presencia de Gdn-HCl como aquellas obtenidas sin partículas esféricas presentaron valores bajos similares, muy cercanos al umbral de corte establecido para considerarlas positivas. Estos resultados permiten concluir que la estructura de las rec-PrP^{res} humanas generadas por PMSA presenta una mayor cantidad de láminas beta comparativamente con aquellas estructuras que se generaron utilizando cualquiera de las otras dos técnicas.

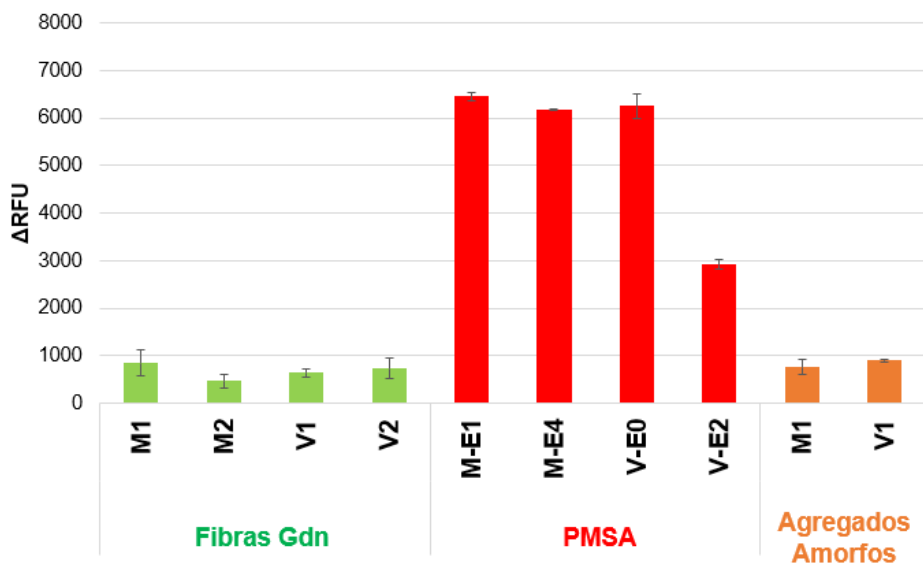


Figura 19. Estudio comparativo de la cantidad de fibras amiloides medidas con Tioflavina T en los productos obtenidos mediante las tres técnicas utilizadas para la formación de diferentes agregados de PrP recombinantes humanas. Gráfico del incremento de unidades relativas de fluorescencia (Δ RFU) con respecto a la rec-PrP de sustrato donde se muestran los niveles de fibras amiloides presentes en cada tipo de producto medidos por triplicado mediante espectrometría de fluorescencia con Tioflavina T (ThT). Con el objetivo de discriminar entre muestras positivas para fibras amiloides y muestras negativas se define el umbral de corte como la media de RFU de 8 tubos con sustrato recombinante humano sin agitar más tres veces su desviación estándar y se normalizan los datos tomando el valor del umbral de corte como RFU = 0. Se observa que las PrP recombinantes malplegadas (rec-PrP^{res}) humanas obtenidas en PMSA (M-E1, M-E4, V-E0 y V-E2) presenta un incremento de fluorescencia mayor que las Fibras Gdn y los Agregados amorfos, indicando mayor cantidad de fibras amiloides o fibras más afines a la unión de ThT, siendo las señales correspondientes a las semillas M-E1, M-E4 y V-E0 de PMSA mayores que la de la semilla V-E2. Se representan la media de los triplicados de cada muestra y las barras de error indican la desviación estándar. Fibras Gdn M1, M2, V1 y V2: material agregado obtenido tras la agitación de sustratos recombinantes humanos M129 (M1 y M2) y V129 (V1 y V2) con 2 M de hidrocloreuro de guanidinio a 30 rpm y 39 °C durante 30 días; PMSA: PrP recombinante humana malplegada M-E1, M-E4, V-E0 y V-E2 obtenidas de forma espontánea en PMSA; Agregados amorfos M1 y V1: material agregado de forma desordenada mediante la agitación de sustratos recombinantes humanos M129 (M1) y V129 (V1) a 1000 rpm y 39 °C sin partículas esféricas durante 7 días.

La resistencia a la digestión con PK de cada una de las muestras se evaluó tras su digestión con cantidades crecientes de PK (1, 5, 10 y 25 μ g/ml) y la posterior visualización de los resultados mediante la tinción de los fragmentos proteicos resistentes (Figura 20). Se observó que las fibras human-Gdn-M-E1, human-Gdn-M-E2, human-Gdn-V-E1 y human-Gdn-V-E2 presentan una baja resistencia a PK. En concreto, las muestras human-Gdn-M-E1 y human-Gdn-V-E1, que contenían una mayor cantidad de fibras amiloides, solo resistieron la digestión con 1 μ g/ml de PK, visualizándose de forma tenue la banda de ~16 kDa y otros fragmentos de menor peso molecular. Por el contrario, las muestras human-Gdn-M-E2 y human-Gdn-V-E2 presentaron una menor resistencia a la digestión con PK, ya que únicamente se visualizaron fragmentos de bajo peso molecular tras su digestión con 1 μ g/ml de PK. Por otro lado, los agregados amorfos agregados-M-E1 y agregados-V-E1 presentaron también una baja resistencia a la digestión con la proteasa mostrando pequeños fragmentos únicamente tras su digestión con 1 μ g/ml de PK. Además, el patrón de bandas electroforético de estas muestras es

diferente al de las rec-PrP^{res} humanas, indicando que se podría tratar de una digestión incompleta más que de una auténtica resistencia a la digestión proteica. Por último, los resultados obtenidos con las rec-PrP^{res} humanas fueron similares a los obtenidos en el apartado 5.1., resultados que confirman de nuevo que la muestra V-E0 es mucho más resistente a la digestión enzimática (> 25 µg/ml) (Figura 20 a y b). Cabe destacar que las diferencias en cuanto a la intensidad de la banda de ~16 kDa observadas en las muestras M-E1, M-E4 y V-E2 en los dos ensayos de PK realizados se deben a que para cada experimento fue necesaria la obtención de más material de cada rec-PrP^{res} mediante su escalado, lo que puede reflejarse en una mayor o menor concentración final de rec-PrP^{res} en cada preparación.

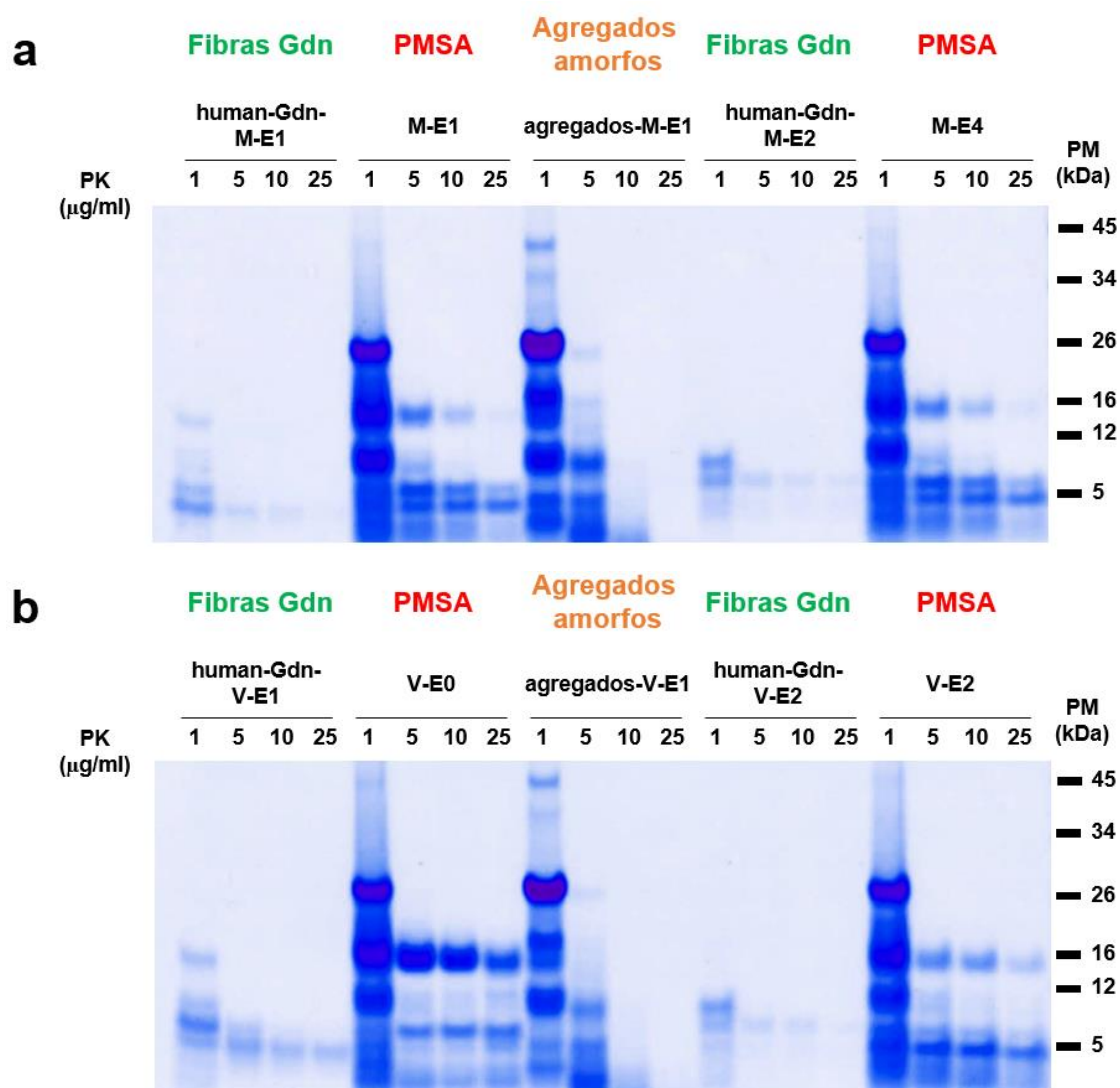


Figura 20. Evaluación de la resistencia a la digestión por proteinasa K de las Fibras Gdn, las semillas de PMSA y los agregados amorfos generados mediante diferentes metodologías. a) Electroforesis y tinción de proteína total donde se muestra la capacidad de resistir concentraciones crecientes de proteinasa K (PK) de las Fibras Gdn obtenidas mediante la agitación a 30 rpm y 39 °C durante 30 días del sustrato recombinante humano M129 (human-Gdn-M-E1 y human-Gdn-M-E2), de las semillas obtenidas en PMSA de forma espontánea con sustrato recombinante humano M129 (M-E1 y M-E4) y los agregados amorfos generados mediante la agitación a 1000 rpm y 39 °C sin partículas esféricas durante 7 días del sustrato recombinante humano M129 (agregados-M-E1). Cada muestra se digirió con 1, 5, 10 y 25 µg/ml de PK y se evaluó la resistencia de cada una de ellas mediante electroforesis y tinción de proteína total. Se observa que las Fibras Gdn (verde) presentan baja resistencia a la digestión con PK, dado que solo resisten la digestión con 1 µg/ml, no visualizándose la banda de ~16 kDa en la muestra

human-Gdn-M-E2. Los agregados amorfos (naranjas) presentan también una baja resistencia a la digestión con PK, con un patrón electroforético de bandas diferente, pudiendo ser indicativo de digestión incompleta. Las muestras de PMSA (rojo) presentan mayor resistencia a PK, manteniendo el patrón de bandas característica de cada una de ellas. PM: marcador de peso molecular. **b)** Electroforesis y tinción de proteína total donde se muestran los mismos datos que en el panel anterior de esta figura pero para las Fibras Gdn obtenidas del sustrato recombinante humano V129 (human-Gdn-V-E1 y human-Gdn-V-E2), de las semillas obtenidas en PMSA de forma espontánea con sustrato recombinante humano V129 (V-E0 y V-E2) y los agregados amorfos generados del sustrato recombinante humano V129 (agregados-V-E1). El procedimiento para evaluar la resistencia a PK fue idéntico al realizado para el panel **a** de esta figura. Se observa que las Fibras Gdn (verde) presentan baja resistencia a la digestión con PK, dado que solo resisten la digestión con 1 µg/ml, no visualizándose la banda de ~16 kDa en la muestra human-Gdn-V-E2. Los agregados amorfos (naranjas) presentan también una baja resistencia a la digestión con PK, con un patrón electroforético de bandas diferente, pudiendo ser indicativo de digestión incompleta, al igual que los obtenidos con sustrato recombinante humano M129. Las muestras de PMSA (rojo) presentan mayor resistencia a PK, manteniendo el patrón de bandas característica de cada una de ellas. PM: marcador de peso molecular.

La propiedad más importante asociada al concepto de prion, su capacidad de auto-propagarse, se testó *in vitro* para cada una de las muestras previamente descritas mediante la aplicación de una única ronda de PMSA de 6 h de duración. Estudios previos en el laboratorio habían mostrado previamente que los priones recombinantes *bona fide* de distintas especies se podían propagar eficientemente en rondas de PMSA de menos de 6 horas, llegando en algunos casos a tiempos inferiores a una hora. Esta habilidad de propagación extraordinariamente rápida parece estar asociada al tipo de PrP por lo que, por practicidad, para proteínas aún en estudio, los tiempos de trabajo se establecen en 24 h. Sin embargo, al igual que la capacidad de propagación de una proteína malplegada se puede evaluar observando la propagación tras su dilución seriada, esta capacidad también puede evaluarse a través de la aplicación seriada de rondas de PMSA a tiempos cortos. En este caso, con el fin de comparar el comportamiento auto-propagativo de las distintas muestras, estas se diluyeron 1:100 en sustrato fresco homólogo y se sometieron a una ronda de PMSA de 6 h de duración. Tras la ronda de PMSA, cada producto se digirió con 25 µg/ml de PK y se realizó una tinción de proteína total. Los resultados muestran que solo las rec-PrP^{res} humanas obtenidas mediante PMSA (M-E1, M-E4, V-E0 y V-E2) son capaces de propagarse, mientras que las fibras Gdn y los agregados amorfos no propagaron en las condiciones fijadas. Tal y como muestra la figura, no se obtuvo rec-PrP^{res} espontánea en los controles de sustrato sin semilla que se sometieron al mismo procedimiento (Figura 21). La menor intensidad de las bandas de ~16 kDa de las muestras M-E1 y M-E4 se debe al acortamiento del tiempo de la ronda de PMSA. Sin embargo, el fragmento predominante de la semilla V-E0 no parece verse afectado por esta reducción del tiempo de la ronda de PMSA, lo que implica que esta tiene una capacidad auto-propagativa muy superior al resto de proteínas malplegadas.

Basándose en los experimentos realizados para caracterizar los diferentes tipos de agregados de rec-PrP generados mediante tres técnicas diferentes, se puede concluir que los productos de PMSA presentan las características esperadas para los priones *bona fide* y son, por tanto, diferentes a las fibras Gdn y a los agregados amorfos descritos anteriormente. Esta caracterización ha permitido distinguir fehacientemente entre los diferentes tipos de rec-PrP malplegadas, diferenciando el

material generado por PMSA de productos generados mediante otras técnicas que no han mostrado las características de un prion *bona fide*. A falta de determinar la capacidad de inducir enfermedad en animales, estos resultados junto con el hecho de que la misma metodología de PMSA ha demostrado la capacidad para generar y propagar priones recombinantes *bona fide* en otras especies, indican que las rec-PrP^{res} humanas presentan las características bioquímicas deseadas y, por tanto, podrían ser también potencialmente infecciosas en modelos animales.

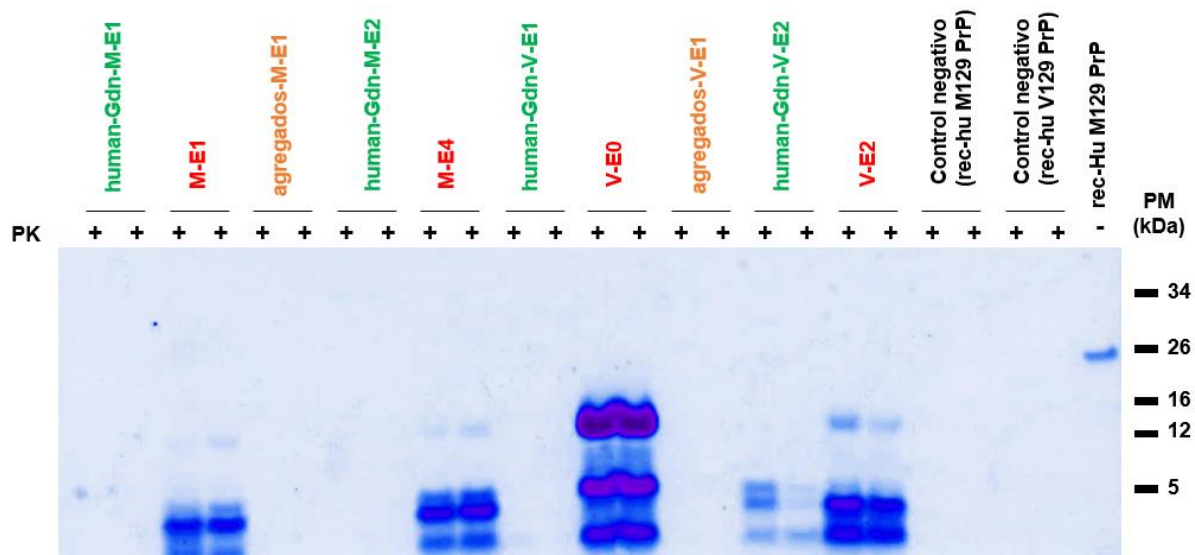


Figura 21. Estudio comparativo de la capacidad de propagación de las PrP malplegadas en PMSA, de las Fibras Gdn y de los agregados amorfos. Electroforesis y tinción de proteína total donde se muestran los productos de una ronda de PMSA digeridos con 25 µg/ml de proteinasa K (PK) inoculados con las PrP malplegadas obtenidas mediante las tres técnicas de malplegamiento. Los productos con cantidades de rec-PrP equiparadas y utilizados como semillas se diluyeron 1:100 en sustrato recombinante homólogo y fueron sometidos a una ronda de PMSA de 6 h en presencia de partícula esférica de zirconio – sílice de 1.0 mm a 700 rpm y 39 °C. Cada producto utilizado como semilla se ensayó por duplicado. Los productos de las Fibras Gdn se indican en verde, aquellos inoculados con las obtenidas en PMSA se indican en rojo y los productos de los agregados amorfos utilizados como semilla se indican de color naranja. Las semillas de PMSA M-E1, M-E4, V-E0 y V-E2 fueron capaces de propagar mediante una ronda de PMSA de 6 h, mientras que los demás productos utilizados como semilla no fueron capaces de inducir el malplegamiento de los sustratos recombinantes por PMSA. La menor intensidad de la banda de ~16 kDa observada para las semillas M-E1, M-E4 y V-E2 se debe a la menor duración de la ronda de PMSA, mientras que la intensidad de la banda de ~16 kDa de la semilla V-E0 no se ve afectada por el acortamiento de la ronda de PMSA, indicando una mayor eficiencia para la propagación. Control negativo: tubos con sustrato recombinante humano M129 (rec-Hu m129 PrP) o V129 (rec-Hu V129 Pr) sin semilla sometidas a PMSA en las mismas condiciones que los tubos con semilla; rec-Hu M129 PrP: sustrato recombinante humano M129 sin digerir; PM: marcador de peso molecular.

5.4. Determinación de la infectividad potencial por PMCA

Debido a los largos periodos de incubación de las enfermedades priónicas, los ensayos *in vivo* para determinar la infectividad de una muestra requieren de largos periodos de tiempo. Una forma alternativa y rápida de evaluar la infectividad potencial de las proteínas malplegadas humanas, previa a los ensayos *in vivo*, consiste en determinar su capacidad de malplegar un sustrato basado en homogeneizados de encéfalos mediante la técnica de PMCA [258, 330]. Este procedimiento mimetiza *in vitro* el escenario de lo que ocurre en el modelo animal dado que la PrP^C de origen encefálico que contiene el sustrato presenta todas las modificaciones post-traduccionales y está complementada con

cofactores presentes en el encéfalo. Así, con el objetivo de establecer si las rec-PrP^{res} humanas son potencialmente infecciosas *in vivo*, estas se utilizaron como semillas para inducir el malplegamiento de dos tipos de sustratos basados en homogeneizados de encéfalos procedentes de dos modelos animales. En primer lugar, se utilizó un sustrato basado en homogeneizados de encéfalos de ratones transgénicos TgNN6h, que expresan la variante polimórfica M129 de la PrP^C humana con dos mutaciones (N181Q y N197Q) las cuales provocan que la PrP^C carezca de N-glicosilaciones [396]. La elección de este modelo se basó en la similitud entre la PrP^C endógena del mismo y las rec-PrP^{res} humanas, ya que ambas carecen de glicosilaciones. Además, ninguno de los modelos animales que expresan PrP^C humana resulta en un sustrato eficiente para la propagación de priones mediante PMCA, incluyendo a los aislados naturales provenientes de encéfalos de individuos afectados. Este problema, aún no resuelto, limitó en gran medida la selección de modelos transgénicos idóneos para tal objetivo. En segundo lugar, se seleccionó el modelo TgVole que expresa la variante polimórfica I109 de la PrP^C de topillo rojo. Este animal ha sido ampliamente utilizado para la caracterización de diferentes cepas priónicas humanas debido a su alta susceptibilidad, considerándose un aceptor universal para la propagación de priones [408-412]. Con el fin de testar la capacidad que tienen los priones recombinantes de malplegar ambos tipos de PrP^C, estos se diluyeron 1:10 en ambos homogeneizados y se sometieron a una primera ronda de 24 h de PMCA. En las rondas sucesivas de PMCA, el producto de la ronda previa se diluyó 1:10 en sustrato fresco y se sometió a una nueva ronda de 24 h, así hasta alcanzar el 100 % de tubos positivos para PrP^{res}. Como controles de posibles contaminaciones y generación espontánea, se incluyeron tubos de sustrato sin semilla en cada una de las rondas y se sometieron al mismo proceso de PMCA. Los resultados se evaluaron mediante digestión con PK y posterior *Western Blot*. En el caso de los sustratos basados en homogeneizados de encéfalos de TgNN6h, solo se propagaron las rec-PrP^{res} humanas M-E1 y M-E4, mientras que las rec-PrP^{res} V-E0 y V-E2, tras 6 rondas seriadas de PMCA, no mostraron capacidad de propagación alguna. Este último resultado probablemente se debe a la existencia de una barrera polimórfica entre las semillas (V129) y el modelo transgénico TgNN6h (M129) (Figura 22 a). En concreto, con la semilla M-E1 se obtuvo material resistente a PK a partir de la ronda 3 en la totalidad de los tubos de PMCA. Sin embargo, la semilla M-E4 no fue capaz de malplegar a la PrP^C del sustrato hasta la ronda 4 y solo en el 50 % de los tubos, mostrando una menor eficiencia, ya que no alcanzó el 100 % de tubos positivos para rec-PrP^{res} hasta la ronda 6 de PMCA. No se observó PrP^{res} en los controles negativos sin semilla que se llevaron a cabo como control de posible malplegamiento espontáneo. Por otro lado, es importante destacar que la PrP malplegada obtenida con este modelo transgénico, al carecer de glicosilaciones, solo presenta una banda resistente a PK no glicosilada, en lugar de las tres bandas características de los priones *bona fide*. En algunas muestras los productos resistentes a PK se visualizaron con la presencia de una doble banda debido a cortes proteolíticos internos de la PrP^C en este modelo. Así, el producto

obtenido con la semilla M-E1 presentó una única banda resistente a PK, mientras que para la semilla M-E4 se obtuvo una doble banda resistente a PK (Figura 22 b), patrones electroforéticos que se mantuvieron durante todas las rondas seriadas de PMCA llevadas a cabo. La diferencia en el patrón electroforético obtenido para cada una de estas semillas podría ser reflejo de diferencias bioquímicas entre ellas. Sin embargo, es necesario llevar a cabo más estudios para caracterizar en profundidad los productos obtenidos con estas dos rec-PrP^{res} y poder determinar fehacientemente que se trata de diferencias bioquímicas entre ellas.

De forma similar al estudio realizado con el modelo TgNN6h, las distintas proteínas malplegadas se sometieron a rondas seriadas de PMCA utilizando homogeneizados de encéfalos de TgVole como sustrato. Este estudio trataba de determinar si las cuatro rec-PrP^{res} obtenidas por PMSA eran capaces de malplegar la PrP^C de este modelo y, por tanto, evidenciar su potencial infectividad *in vivo* en modelos que expresen la PrP^C de topillo rojo. Los resultados obtenidos mediante digestión con PK y *Western Blot* muestran que tanto las rec-PrP^{res} M-E1 y M-E4 y las rec-PrP^{res} V-E0 y V-E2 malplegaron la PrP^C de topillo rojo, pero con ciertas diferencias entre ellas (Figura 22 c y d). Las semillas M-E1 y M-E4 se propagaron en el 100 % de los tubos desde la ronda 1 de PMCA, mientras que las semillas V-E0 y V-E2 necesitaron dos rondas de PMCA para propagarse en el 100 % de los tubos. Estos resultados indican que las rec-PrP^{res} M129 presentan una mayor eficiencia para malplegar la PrP^C del sustrato de TgVole que la del sustrato de TgNN6h. Los controles negativos sin semilla no mostraron PrP^{res} en ninguna de las rondas de PMCA.

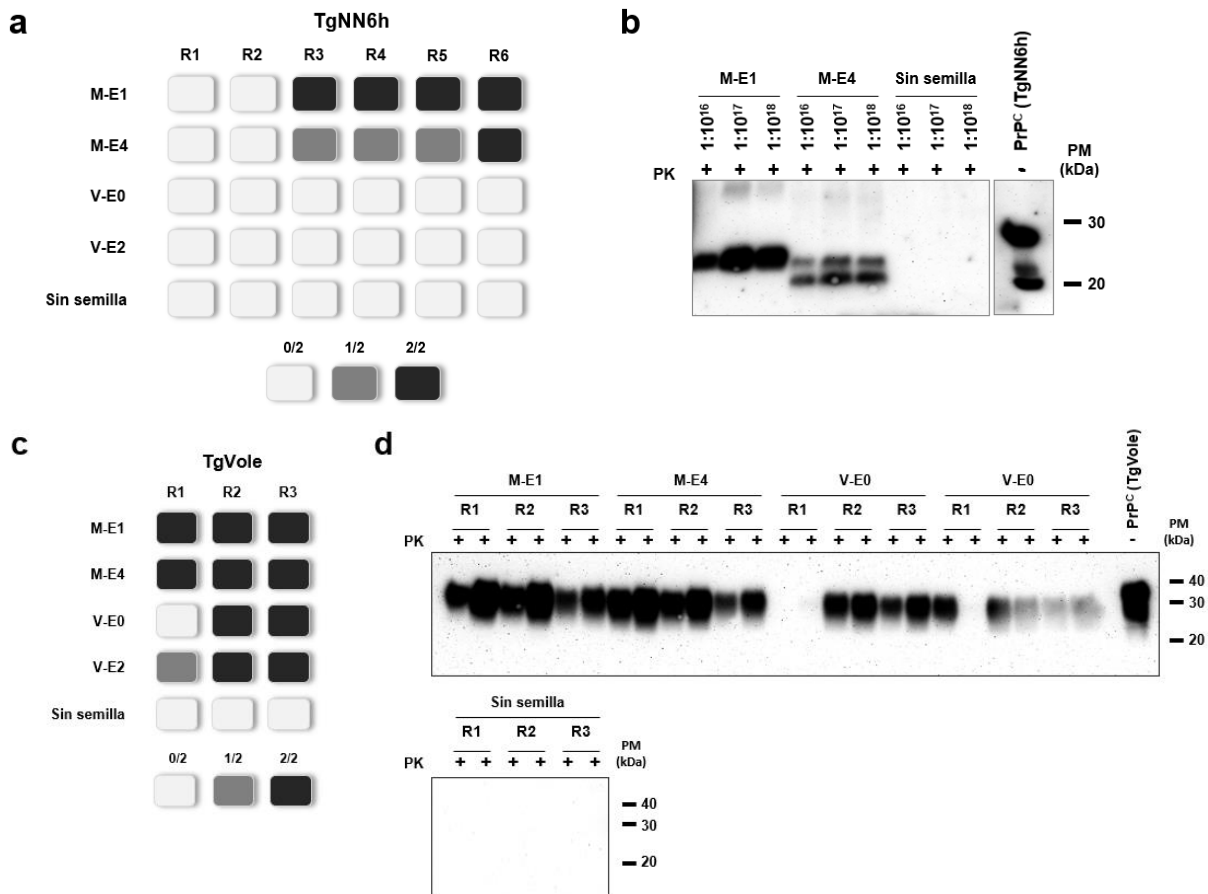


Figura 22. Determinación de la infectividad potencial *in vivo* mediante PMCA basada en sustratos con PrP^C de ratones transgénicos de las PrP recombinantes humanas malplegadas en PMSA. a) Representación gráfica de la capacidad de propagación de las PrP recombinantes malplegadas (rec-PrP^{res}) humanas M-E1, M-E4, V-E0 y V-E2 mediante rondas seriadas (R1 – R6) de PMCA basada en homogeneizados de encéfalo de ratones TgNN6h. Las semillas recombinantes humanas se diluyeron 1:10 en el sustrato y se sometieron a una ronda de PMCA de 24 h. Para la realización de las rondas seriadas, el producto de la ronda anterior se diluyó 1:10 en sustrato fresco y se sometió a una nueva ronda de PMCA. Como control de la generación espontánea de PrP^{res} y contaminación cruzada se colocaron tubos con el mismo sustrato sin semilla. La evaluación de los resultados se llevó a cabo mediante la digestión con 25 µg/ml de proteinasa K (PK) de los productos de cada ronda de PMCA, electroforesis y *Western Blot* utilizando el anticuerpo monoclonal 3F4 (1:10 000). Cada semilla se ensayó por duplicado. El número de tubos con PrP^{res} detectable tras las rondas seriadas de PMCA se ha señalado con distintas intensidades de gris, tal y como se indica en la leyenda situada en la parte inferior de la figura. Las semillas M-E1 y M-E4 son capaces de propagar en este sustrato dando lugar a PrP^{res} a partir de la tercera ronda de PMCA, aunque con eficiencia diferente, mientras que las semillas V-E0 y V-E2 no muestran capacidad de propagar en sustrato de TgNN6h. **b)** *Western Blot* representativo de los productos obtenidos tras las sucesivas rondas de PMCA con las semillas M-E1 y M-E4 en sustrato TgNN6h. Se indican las diluciones de la semilla original alcanzadas (1:10¹⁶, 1:10¹⁷ y 1:10¹⁸) mediante rondas seriadas de PMCA. Los productos de cada ronda mostrada se digirieron con PK (25 µg/ml) y se evaluó la presencia de rec-PrP^{res} utilizando el anticuerpo monoclonal 3F4 (1:10 000). Se observan diferencias en el patrón electroforético de la rec-PrP^{res} obtenida con cada una de las semillas, pudiendo ser indicativo de diferencias en las propiedades biológicas de cada una de ellas. PrP^C (TgNN6h): homogeneizado de encéfalo de ratones TgNN6h sin digerir utilizados como sustrato para mostrar las diferencias con la rec-PrP^{res} obtenida en PMCA. **c)** Representación gráfica de la capacidad de propagación de las rec-PrP^{res} humanas M-E1, M-E4, V-E0 y V-E2 mediante rondas seriadas (R1 – R3) de PMCA basada en homogeneizado de encéfalo de ratones TgVole. Las semillas recombinantes humanas se diluyeron 1:10 en el sustrato y se sometieron a una ronda de PMCA de 24 h. Para la realización de las rondas seriadas, el producto de la ronda anterior se diluyó 1:10 en sustrato fresco y se sometió a una nueva ronda de PMCA. Como control de la generación espontánea de PrP^{res} y contaminación cruzada se colocaron tubos con el mismo sustrato sin semilla. La evaluación de los resultados se llevó a cabo mediante la digestión con PK (25 µg/ml) de los productos de cada ronda de PMCA, electroforesis y *Western Blot* utilizando el anticuerpo monoclonal SAF83 (1:400). Cada semilla se ensayó por duplicado. El número de tubos con PrP^{res} detectable tras las rondas seriadas de PMCA se ha señalado con distintas intensidades de gris, tal y como se indica en la leyenda situada en la parte inferior de la figura. Todas las semillas recombinantes humana fueron capaces de propagar en este tipo de sustrato, aunque se observan diferencias en la capacidad de propagación entre las semillas de la variante polimórfica M129 (M-E1 y M-E4) y las semillas de la variante polimórfica V129 (V-E0 y V-E2), con mayor eficiencia para las primeras. **d)** *Western Blot* de los productos obtenidos tras las tres rondas de PMCA con las semillas recombinantes humanas en sustrato TgVole. Los productos de cada ronda se digirieron con PK (25

µg/ml) y se evaluó la presencia de PrP^{res} utilizando el anticuerpo monoclonal SAF83 (1:400). PrP^C (TgVole): homogeneizado de encéfalo de ratones TgVole sin digerir utilizados como sustrato para mostrar las diferencias con la rec-PrP^{res} obtenida en PMCA.

Con el objetivo de llevar a cabo los ensayos de infección en los distintos modelos animales, las semillas M-E1 y M-E4 se continuaron propagando tras sucesivas diluciones en el sustrato TgNN6h hasta alcanzar una dilución final de al menos 1:10¹⁵. Esta propagación seriada tenía por objeto eliminar por completo la semilla original. Los productos de las últimas rondas de PMCA (Figura 22 b), así como los productos originales obtenidos de forma espontánea mediante PMSA, se han inoculado en ratones transgénicos TgNN6h, estando actualmente a la espera de observar signos clínicos indicativos de neurodegeneración. El objetivo de inocular el producto obtenido de las rondas de PMCA es determinar si la adaptación de la semilla original por PMCA a este modelo provoca un acortamiento de los tiempos de incubación en los ratones y comparar la infectividad entre las rec-PrP^{res} originales y los productos adaptados a TgNN6h. De la misma forma, las distintas proteínas recombinantes se han preparado para su inoculación en el modelo TgVole. Este estudio está actualmente en espera de realización.

Todos estos resultados indican que las rec-PrP^{res} humanas espontáneas presentan un alto potencial infeccioso, tanto en el modelo humanizado TgNN6h como en el modelo TgVole. Se trata de un indicio que se añade a su alta resistencia a PK y a la extraordinaria capacidad de propagación *in vitro* que difiere de la presentada por otros agregados de PrP obtenidos mediante otras metodologías. Por todo ello, podemos concluir que las rec-PrP^{res} humanas presentan características de priones *bona fide*, de inestimable valor para el cribado masivo de compuestos anti-priónicos.

6. Adaptación de las rec-PrP^{res} recombinantes humanas a un sistema de cribado masivo basado en diluciones y prueba de concepto

Las cuatro rec-PrP^{res} humanas generadas de forma espontánea mediante PMSA presentan la misma capacidad de propagación mediante diluciones seriada, siendo todas ellas capaces de propagar hasta una dilución de 1:10⁷, por lo que, basándonos en este criterio, todas resultarían idóneas para un sistema de cribado masivo basado en diluciones seriadas. Además, si se llegan a observar características distintivas en los estudios de inoculación *in vivo* indicando que constituyen diferentes cepas, podrían utilizarse todas ellas en panel para evitar perder potenciales compuestos por mostrar especificidad de cepa. Sin embargo, el objetivo de esta tesis doctoral no es llevar a cabo un cribado masivo de compuestos, sino desarrollar y validar mediante una prueba de concepto un nuevo sistema de cribado basado en priones recombinantes *bona fide* humanos. Para ello, se seleccionó la rec-PrP^{res} V-E0 para llevar a cabo la adaptación y prueba de concepto, ya que es la que presenta mayor resistencia a PK y un patrón electroforético fácilmente distinguible, ambas características favorables

para la detección de rec-PrP^{res} y monitorización de posibles cambios no deseados durante su adaptación al nuevo sistema de cribado. Sin embargo, cabe esperar que, al presentar características similares, salvo la capacidad de propagar en PMCA basada en homogeneizados de encéfalos de TgNN6h, las cuatro cepas seleccionadas presenten comportamientos similares y se puedan adaptar de igual modo a las condiciones de cribado de compuestos mediante PMSA.

6.1. Adaptación de las PrP recombinantes humanas malplegadas al sistema de PMSA para el cribado de compuestos anti-priónicos

El sistema de PMSA adaptado a PrP de roedores, como topillo rojo o ratón, funciona en tubos de diferentes tamaños y para distintos volúmenes de sustrato, lo que facilita el escalado de los productos obtenido mediante este sistema [330]. Para la obtención de las nuevas rec-PrP^{res} humanas, se utilizaron tubos de 2 ml, con un volumen de sustrato de entre 500 – 800 μ l. Este formato permitió la obtención de rec-PrP^{res} humanas de forma espontánea y su visualización mediante tinción de proteína total. Este procedimiento directo es más informativo que la detección mediada por anticuerpos (*Western Blot*) dado que no limita la observación de ningún fragmento que algunos anticuerpos podrían no detectar. Sin embargo, para un sistema de cribado masivo, este formato de tubos no es el adecuado, ya que no permite testar una gran cantidad de compuestos al mismo tiempo debido a limitaciones de equipamiento, además de requerir cantidades de compuestos muy superiores a los que normalmente se disponen en las librerías químicas. Por tanto, el primer cambio llevado a cabo fue realizar la propagación de la semilla V-E0 utilizando tubos de menor tamaño, de 0.2 ml, y consecuentemente utilizando un menor volumen de sustrato. Así, en primer lugar, se determinó el volumen de sustrato necesario para alcanzar una propagación similar a la obtenida en tubos de 2 ml y 500 – 800 μ l de sustrato. Para ello, la semilla V-E0 se diluyó de forma seriada desde 1:10¹ hasta 1:10⁸ en diferentes volúmenes de sustrato recombinante, hasta alcanzar 50, 125 y 180 μ l de volumen final en los nuevos tubos. Estos se sometieron a una ronda de PMSA de 24 h en presencia de partículas esféricas de zirconio-sílice de 1.0 mm y a 1000 rpm de agitación. Como control negativo para la medición de la autofluorescencia de la ThT y de la formación de agregados inespecíficos durante el proceso de PMSA se prepararon tubos con sustrato sin semilla que permitieron establecer el umbral de corte para la medida de fluorescencia. Los resultados se obtuvieron tras la medición por espectrometría de la fluorescencia emitida por la ThT, dado que previamente se había determinado que la sensibilidad de este sistema de detección presenta una buena correlación con la observación directa de bandas resistentes tras la tinción total de proteínas (Figura 23). Esta forma de detección facilita y acelera el cribado masivo de compuestos en comparación con las otras técnicas bioquímicas que requieren de digestión con PK, electroforesis y el uso de anticuerpos. Los resultados obtenidos

para los diferentes volúmenes testados muestran que un volumen de 180 μ l permite la propagación óptima de la semilla, incluso cuando esta se diluye 1:10⁶ veces (100 %) o 1:10⁷ veces (50 %); de forma similar a los resultados obtenidos utilizando volúmenes muy superiores en tubos de 2 ml (Figura 24 a). Por el contrario, una reducción del volumen final en el tubo de 0.2 ml provocó una reducción de la capacidad de propagación de la semilla. Por ello, se estableció un volumen de 180 μ l como el volumen óptimo para el desarrollo del sistema de cribado de compuestos. Al obtener una eficiencia de propagación similar al formato de tubos de 2 ml, la velocidad de agitación no se modificó y se mantuvo a 1000 rpm.

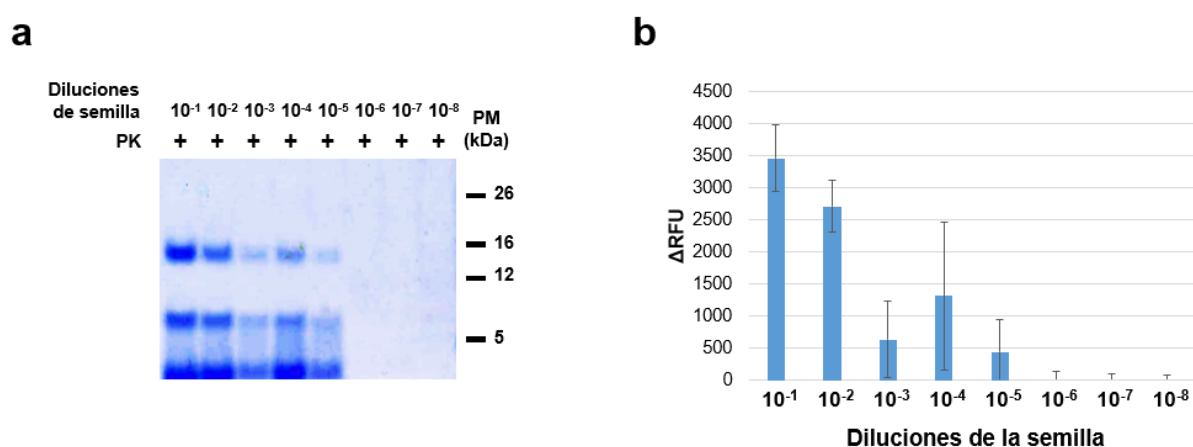


Figura 23. Comparación de la detección de PrP malplegada recombinante mediante las técnicas de tinción de proteína total y espectrometría con Tioflavina T. **a)** Electroforesis y tinción de proteína total que muestran los niveles de propagación de la semilla V-E0 en dilución seriada (1:10¹ – 1:10⁸) utilizando los parámetros de propagación óptimos (1000 rpm y 180 μ l de volumen) a excepción de la duración de la ronda de PMSA que fue de 6 h. Todos los productos obtenidos tras la PMSA fueron digeridos con 25 μ g/ml de proteinasa K (PK). PM: marcador de peso molecular. **b)** Representación gráfica del incremento de unidades relativas de fluorescencia (Δ RFU) con respecto al umbral de corte establecido donde se muestran los niveles de fibras amiloides presentes en las mismas muestras que en el panel anterior de esta figura. Cada medición se realizó por triplicado mediante espectrometría de fluorescencia con Tioflavina T (ThT). Con el objetivo de discriminar entre muestras positivas para fibras amiloides y muestras negativas se define el umbral de corte como la media de RFU de 8 tubos con sustrato recombinante humano sin semilla y sometidos a PMSA, más tres veces su desviación estándar. Cada dilución fue medida por triplicado. Se representa la media de los triplicados de cada muestra y las barras de error indican la desviación estándar. Todos los datos se normalizan con respecto al umbral de corte establecido. En ambos casos conseguimos detectar una propagación efectiva en las diluciones seriadas 1:10⁵ y menores.

Una vez establecido el volumen óptimo que permite una ventana de propagación amplia que favorece la diferenciación de aquellos compuestos con capacidades de inhibición muy diversa, se determinó la variabilidad intrínseca del propio sistema. Esto permite definir un requisito mínimo de reducción de la propagación con respecto al control positivo que debe provocar el compuesto testado para considerarlo inhibidor de forma fehaciente. En la Figura 24 b se representan los valores medios de fluorescencia (Δ RFU) obtenidos en todas las réplicas realizadas para un volumen de 180 μ l, observándose cierta variabilidad entre las réplicas. Por ello, se prepararon 10 réplicas de diluciones seriadas de la semilla de forma similar a las que se utilizarán como control de propagación durante el cribado de compuestos. La semilla se diluyó de forma seriada en el sustrato recombinante desde 1:10¹

hasta $1:10^8$ y se añadió DMSO a una concentración final de 0.5% como vehículo en el que están disueltos los compuestos a testar. Todas las diluciones se sometieron a una ronda de 24 h de PMSA en las condiciones previamente establecidas y la fluorescencia de cada muestra se analizó tras la adición de ThT. Los resultados muestran como el 90% de las réplicas alcanzaron una dilución máxima de $1:10^6$ y el 50% de las diluciones alcanzaron una dilución máxima de $1:10^7$. Únicamente una dilución de las 10 réplicas (10%) alcanzó una dilución máxima de $1:10^4$, lo que podría deberse a la variabilidad técnica del proceso de preparación de las diluciones y/o a la propia variabilidad del sistema de PMSA (Figura 25). Por tanto, teniendo en cuenta una dilución máxima media durante el proceso de propagación del control de $1:10^6$ y que no se obtuvieron réplicas a diluciones máximas menores de $1:10^4$, se estableció que solo se aceptara como posibles inhibidores aquellos compuestos que redujeran la propagación de la semilla utilizada 1000 veces o más respecto a la dilución seriada utilizada como control que contiene el vehículo DMSO.

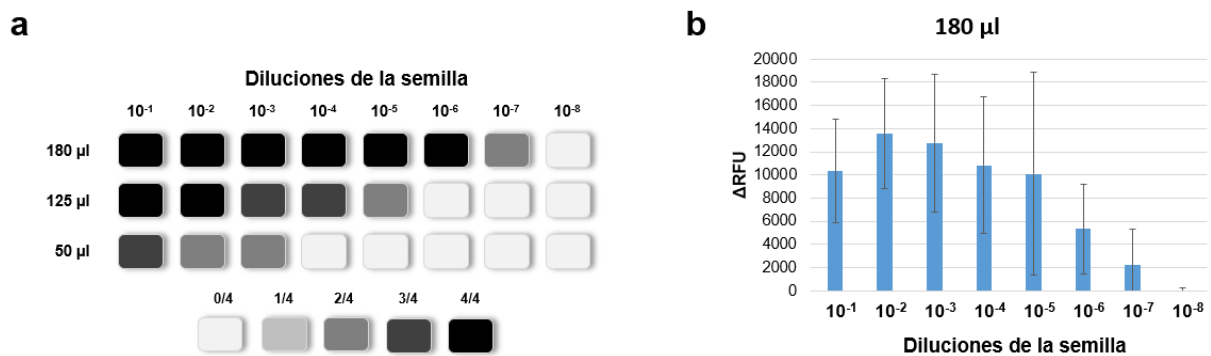


Figura 24. Estudio de la capacidad de propagación de la semilla V-E0 en dilución seriada mediante PMSA utilizando distintos volúmenes de reacción. a) Representación gráfica de los resultados de PMSA correspondientes a las diluciones seriadas realizadas con la semilla recombinante humana V-E0 en función de los volúmenes de reacción utilizados (50, 125 y 180 μ l). La semilla se diluyó $1:10^1 - 1:10^8$ en sustrato recombinante y se sometió en presencia de partículas esféricas de zirconio – sílice de 1.0 μ m, a una ronda de PMSA de 24 h a 1000 rpm y 39 $^{\circ}$ C. La detección de PrP recombinante malplegada (rec-PrP^{res}) en cada muestra se llevó a cabo mediante la digestión con 25 μ g/ml de proteinasa K (PK), electroforesis y posterior tinción de proteína total. Cada dilución se ensayó por cuadruplicado. El número de tubos con rec-PrP^{res} detectable tras la ronda de PMSA se ha señalado con distintas intensidades de gris, tal y como se indica en la leyenda situada en la parte inferior de la figura. Se observa que el volumen de reacción más efectivo para la propagación es de 180 μ l, que en las condiciones utilizadas permite la propagación de rec-PrP^{res} diluida $1:10^7$. b) Representación gráfica del incremento de unidades relativas de fluorescencia (Δ RFU) con respecto al umbral de corte establecido donde se muestran los valores medios de fibras amiloides detectados en las cuatro réplicas de 180 μ l de volumen de reacción mostradas en el panel anterior de esta figura. Cada medición se realizó por triplicado mediante espectrometría de fluorescencia con Tioflavina T (ThT). Con el objetivo de discriminar entre muestras positivas para fibras amiloides y muestras negativas se define el umbral de corte como la media de RFU de 8 tubos con sustrato recombinante humano sin semilla y sometidos a PMSA, más tres veces su desviación estándar. Se representa la media de los triplicados de cada muestra y las barras de error indican la desviación estándar. Se observa una propagación efectiva tanto mediante electroforesis y tinción de proteína total como por espectrometría de fluorescencia, en las diluciones seriadas $1:10^7$ y menores a 180 μ l de reacción.

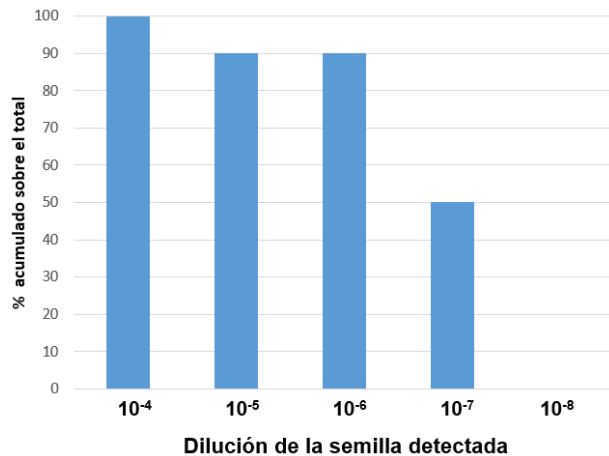


Figura 25. Estudio de la reproducibilidad del sistema de PMSA para el cribado masivo con la semilla recombinante humana V-E0 en diluciones seriadas. Representación gráfica de la dilución máxima acumulada alcanzada por 10 réplicas de la semilla recombinante humana V-E0 en dilución seriada (1:10⁴ – 1:10⁸) a 180 µl de volumen de reacción sometidos a una ronda de PMSA en presencia de partículas esféricas de zirconio – sílice de 1.0 mm, durante 24 h a 1000 rpm y 39 °C. Los resultados muestran el porcentaje de réplicas donde ha habido propagación por cada dilución medida mediante espectrometría de fluorescencia con Tioflavina T (ThT). Con el objetivo de discriminar entre muestras positivas para fibras amiloides y muestras negativas, se define el umbral de corte como la media de RFU de 8 tubos con sustrato

recombinante humano sin semilla y sometidos a PMSA, más tres veces su desviación estándar. Cada muestra fue medida por triplicado. La dilución máxima en la que se observó propagación fue 1:10⁷ en el 50 % de las réplicas, mientras que en el 90% se alcanzó una dilución mínima de 1:10⁶ y solo el 10 % con dilución máxima de 1:10⁴.

Antes de efectuar la prueba de concepto donde se quería evaluar la capacidad de inhibición de un grupo reducido de compuestos con alto potencial anti-priónico, se testó el efecto anti-propagativo de cuatro compuestos que habían demostrado previamente diferentes capacidades de inhibición en otros sistemas: un compuesto tetrapirrólico con elevada capacidad de inhibición (denominado Tetrapirrol control de ahora en adelante) (resultados pendientes de publicación) y los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85 [332] que se describen al inicio de la tesis y que se seleccionaron para determinar si presentaban especificidad de especie y/o cepa. Para ello, se realizaron diluciones de la semilla en sustrato recombinante desde 1:10⁴ hasta 1:10⁸ y se añadió cada compuesto a una concentración final de 100 µM o 50 µM. Además, se incluyó una dilución con DMSO a una concentración final de 0.5% como control del vehículo en el que están disueltos los compuestos y una dilución con sustrato sin semilla a modo de control negativo para la medición con ThT. Posteriormente, se midió la presencia o no de fibras amiloides mediante el uso de ThT. Además, los resultados se verificaron mediante *Western Blot*, dado que determinados compuestos, debido al fenómeno de desactivación fluorescente o *quenching*, pueden ser falsos positivos. Se observa que el Tetrapirrol control inhibe 1x10⁴ veces la propagación priónica con respecto al control DMSO tanto a 100 µM como a 50 µM, indicando que mantiene también su alta capacidad anti-priónica para esta rec-PrP^{res} humana. En relación a los compuestos detectados previamente en el sistema de cribado basado en un prion recombinante de topillo rojo, solo los compuestos L2.JM56 y L2.JM85 a 100 µM inhibieron la propagación priónica de esta rec-PrP^{res} humana, mostrando una capacidad de inhibición similar a la del Tetrapirrol control (1x10⁴ con respecto al control DMSO). Sin embargo, el compuesto L2.JM33 no inhibió la propagación priónica a ninguna de las concentraciones testadas. Es la primera vez que se observa que el compuesto L2.JM85 inhibe la propagación priónica de una rec-PrP^{res} humana (Figura 26, Tabla 2), lo que sugiere la existencia de una especificidad de inhibición para la cepa que constituye esta nueva rec-PrP^{res} V129

humana. De igual forma, el compuesto L2.JM33 que inhibe la propagación de una cepa recombinante humana por PMCA pero no reduce la propagación de la rec-PrP^{res} humana utilizada en este nuevo sistema, sugeriría la existencia de una especificidad de cepa o podría ser debido a las diferencias en las concentraciones finales a las que se testaron los compuestos en cada sistema (500 μ M en PMCA *versus* 100 μ M y 50 μ M en el nuevo sistema de PMSA) (Figura 26, Tabla 2). Sin embargo, el compuesto L2.JM56 es el que presenta una menor especificidad de cepa dado que fue capaz de inhibir la propagación de la cepa recombinante humana utilizada en PMCA y también la cepa seleccionada para el desarrollo del nuevo sistema de cribado específico para proteínas humanas (Figura 26). Por tanto, se concluye que el nuevo sistema de cribado basado en una rec-PrP^{res} humana permite detectar compuestos con alta capacidad de inhibición de la propagación priónica, además de detectar aquellos posibles inhibidores que presentan especificidad de especie y/o cepa priónica.

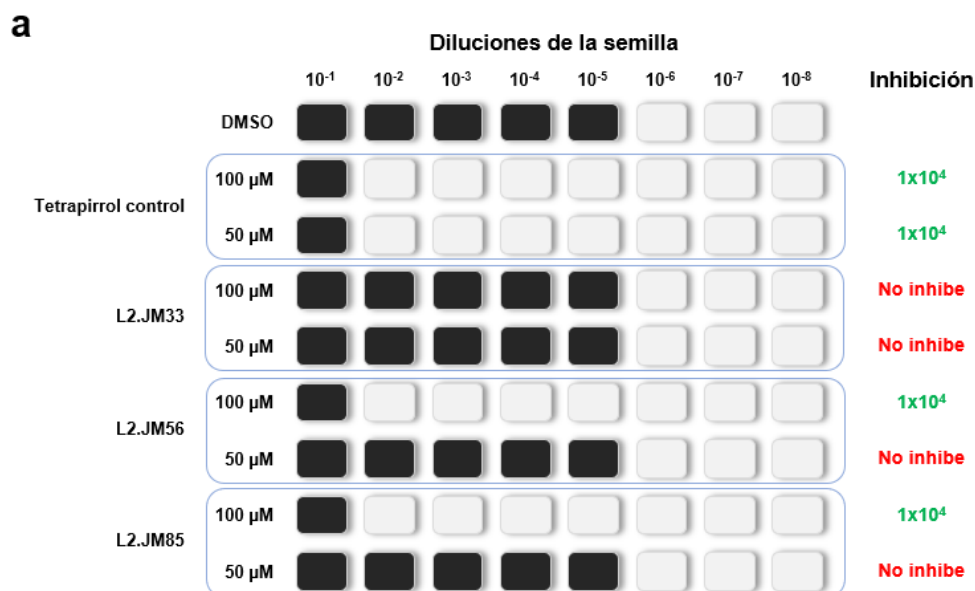


Figura 26. Evaluación de la capacidad de inhibir la propagación de PrP recombinante malplegada V-E0 de compuestos con actividad anti-priónica conocida. Representación gráfica de la capacidad de inhibir la propagación mediante diluciones seriadas de la semilla recombinante humana V-E0 del Tetrapirrol control y los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85 detectados previamente en el sistema de cribado basado en rec-PrP de topillo rojo. Tras la dilución 1:10¹ – 1:10⁸ de la semilla, se añadieron los compuestos a evaluar a una concentración final de 100 o 50 μ M y todas las diluciones fueron sometidas a una ronda de PMSA de 24 h en las condiciones de PMSA óptimas establecidas previamente. Como control de la dilución máxima a la que propaga la semilla se incluyó una dilución con DMSO (vehículo en el que están disueltos los compuestos). La capacidad de inhibición de un compuesto determinado se estableció en relación a la dilución máxima alcanzada en presencia de dicho compuesto y la dilución máxima alcanzada por el control DMSO. Los resultados se evaluaron mediante la medición por duplicado de los niveles de fibras amiloides en cada muestra utilizando espectrometría de fluorescencia con Tioflavina T (ThT). Los cuadrados negros indican aquellas diluciones en las que se ha detectado propagación. A la derecha (Inhibición vs DMSO), se indica la reducción de la propagación que cada compuesto provoca con respecto al control DMSO. En verde, aquellos que muestran una alta capacidad de inhibición (reducción de 1000 veces o más de la propagación) y en rojo aquellos compuestos que no inhiben la propagación. Ningún compuesto ha mostrado baja capacidad de inhibición (reducción de 10 – 100 veces la propagación con respecto al control). Se observa que tanto el Tetrapirrol control a 100 y 50 μ M muestran la misma capacidad de inhibir la propagación de la semilla V-E0. Por el contrario, el compuesto L2.JM33 a ambas concentraciones testadas y los compuestos L2.JM56 y L2.JM85 a 50 μ M no inhiben la propagación de la semilla V-E0.

6.2. Prueba de concepto del sistema de cribado utilizando un panel de compuestos tetrapirrólicos

Una vez demostrado que la PMSA basada en rec-PrP^{res} humana detectaba eficientemente la inhibición producida por compuestos muy variados como el Tetrapirrol y las moléculas L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85, se seleccionó un número reducido de tetrapirroles basándose en su semejanza estructural al utilizado como control de inhibición. Además, los tetrapirroles seleccionados (nombrados a partir de ahora como Tetrapirrol 1, Tetrapirrol 2, etc.) fueron previamente testados mediante el sistema de cribado de PMSA basado en un prion recombinante de topillo rojo, mostrando todos ellos la capacidad de inhibir la propagación de este prion. Esta información nos permitió seleccionar los nuevos compuestos para la prueba de concepto, y evaluar si estos compuestos tetrapirrólicos presentaban especificidad de especie o cepa. Los tetrapirroles son compuestos que han sido ampliamente estudiados en el campo de los priones como potenciales inhibidores, siendo el TMPyP-FeIII el más conocido y estudiado hasta la fecha [301]. Teniendo en cuenta la elevada afinidad de algunos tetrapirroles como el TMPyP-FeIII, que se une en un ratio 1:1 a la PrP, o como el Tetrapirrol control, cuyos estudios preliminares mediante RMN indican que se une a la PrP humana con una afinidad similar a la del TMPyP-FeIII, se decidió testar los tetrapirroles seleccionados a una concentración final de 50 μ M, lo que representaría un ratio rec-PrP:Tetrapirrol de aproximadamente 1:25. De esta forma, además de asegurar la interacción con la PrP de incluso aquellos que presenten menor afinidad por ella, podremos detectar tetrapirroles con la misma o mayor capacidad de inhibición que la del Tetrapirrol control. Hay que tener en cuenta que una posible estrategia terapéutica sería la combinación de varias moléculas, cada una de ellas con características o propiedades específicas. Por tanto, es importante detectar incluso aquellas que son menos eficaces inhibiendo la propagación, dado que toda la información que se obtenga contribuirá al desarrollo de nuevos estudios de mejora de los inhibidores mediante química médica. En total se seleccionaron 18 compuestos tetrapirrólicos que se prepararon a una concentración de 10 mM en 100% de DMSO, y con los que se trabajó a concentración final de 50 μ M.

El testado de todos ellos se llevó a cabo de forma simultánea. Para ello, se prepararon diluciones seriadas de 1:10¹ a 1:10⁸ y el compuesto en estudio se añadió a cada dilución. Además, se prepararon ocho tubos con sustrato sin semilla como control negativo de la medición con ThT, una dilución seriada con DMSO como control de propagación y una dilución seriada con el Tetrapirrol control a 50 μ M como control positivo de inhibición. Todas las muestras se sometieron a una ronda de PMSA de 24 h en las condiciones establecidas como óptimas y se analizaron los resultados mediante fluorimetría con ThT. Al tratarse de una prueba de concepto y no de un cribado masivo de compuestos, en el cual la realización de técnicas de *immunoblot* sería inabordable técnicamente, los resultados inicialmente se

obtuvieron mediante ThT y posteriormente se verificaron mediante *Western Blot*. Esto permitía la detección de falsos positivos dado que algunos de los tetrapirroles podrían provocar el efecto de desactivación fluorescente o *quenching*. De esto modo, también se evaluó la sensibilidad del sistema de ThT con respecto al *Western Blot* para detectar inhibición. En la Figura 27 se muestra el flujo de trabajo realizado durante la prueba de concepto y los resultados obtenidos en ella tanto por medición con ThT como por *Western Blot*. El criterio para establecer el nivel de inhibición de cada compuesto se mantuvo constante durante toda la tesis doctoral, considerando como alta capacidad de inhibición cuando los compuestos provocan una reducción de la propagación con respecto al control DMSO de 1000 veces o más, como baja capacidad de inhibición cuando la reducción es de 10 – 100 veces y sin inhibición cuando no se observa reducción alguna de la propagación priónica con respecto al control DMSO. De esta forma, las mediciones fluorimétricas con ThT de los 18 tetrapirroles testados mediante este nuevo sistema de cribado específico para humanos mostraron que 14 de ellos presentaron alta capacidad de inhibición, 3 una baja capacidad y solo 1 de ellos no fue capaz de inhibir la propagación priónica. La posterior confirmación de los resultados por *Western Blot* determinó que el Tetrapirrol 6 era un falso positivo debido a la desactivación fluorescente o *quenching*, además de indicar que el Tetrapirrol 16 inhibió 1×10^2 la propagación priónica en lugar de 1×10^4 como indicaba la medición con ThT, pasando a ser considerado un compuesto con baja capacidad de inhibición y no con alta capacidad. Estas pequeñas diferencias observadas entre los dos procedimientos podrían ser debidas a las diferencias en la sensibilidad que presentan ambos métodos, pero en ningún caso supuso un falso negativo, lo que provocaría la pérdida de un compuesto con potencial anti-priónico (Figura 28). En la Figura 29 se muestra la imagen de *Western Blot* obtenida del control DMSO, el Tetrapirrol control, el Tetrapirrol 8 (alta capacidad de inhibición) y el Tetrapirrol 15 (baja capacidad de inhibición) a modo representativo.

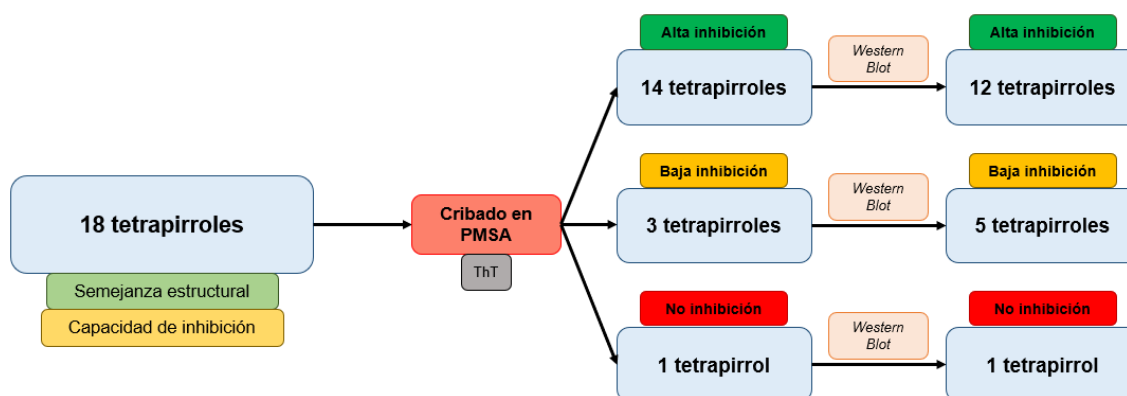


Figura 27. Esquema del flujo de trabajo realizado como prueba de concepto del sistema de cribado masivo con una biblioteca de compuestos tetrapirrólicos. Se seleccionaron 18 tetrapirroles en base a su semejanza estructural con otros compuestos tetrapirrólicos y a su capacidad anti-priónica determinada previamente en un sistema de cribado masivo basado en un prion recombinante de topillo rojo. Tras la realización de la ronda de PMSA de las diluciones seriadas ($1:10^1 - 1:10^8$) de la semilla V-E0 en presencia de los compuestos inhibidores a una concentración final de $50 \mu\text{M}$, la presencia de rec-Pr^{Pres} en cada muestra se determinó mediante espectrometría de fluorescencia con Tioflavina T (Th) y se confirmó mediante *Western*

blot debido a que determinados compuestos pueden dar lugar a falsos positivos mediante espectrometría debido al fenómeno de desactivación fluorescente o *quenching*. Tras la medición con ThT y posterior confirmación mediante *Western Blot*, 12 compuestos tetrapirrólicos mostraron alta capacidad de inhibición (reducción de 1000 veces o más de la propagación priónica), 5 se consideraron que presentaban baja capacidad de inhibición (reducción de 10 – 100 veces de la propagación priónica) y solo 1 no mostró capacidad de inhibir la propagación de la PrP recombinante malplegada V-E0.

En este estudio se ha mostrado que 17 de los 18 tetrapirroles que mostraron capacidad de inhibir la propagación de un prion recombinante de topillo rojo también inhibieron la propagación de una rec-PrP^{res} humana. Sin embargo, la evaluación fina del grado de inhibición asociado a cada una de las moléculas en cada uno de los sistemas revela que existen importantes diferencias: 12 de ellas mostraron un alto potencial anti-priónico, 5 mostraron una baja capacidad anti-priónica y una de ellas mostró una inhibición exclusiva para la propagación de la proteína de topillo rojo. Por todo ello, el cribado masivo de compuestos químicos llevado a cabo en un sistema específico para EET humanas permitiría detectar aquellas moléculas con un mayor potencial para el desarrollo de una terapia en humanos.

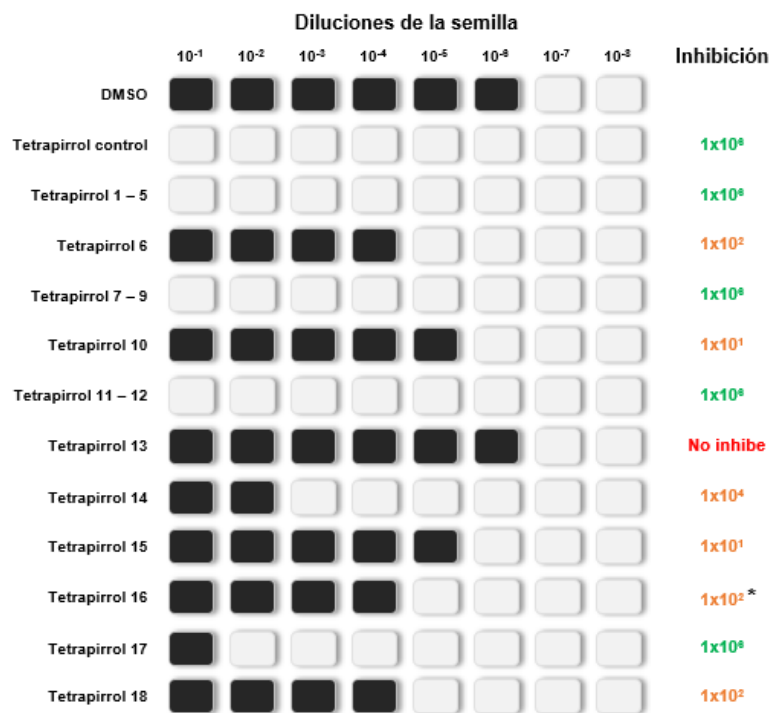


Figura 28. Resultados de la prueba de concepto del nuevo sistema de cribado masivo específico para EET humanas utilizando un panel de compuestos tetrapirrólicos. Representación gráfica de la capacidad de inhibir la propagación mediante diluciones seriadas de la semilla recombinante humana V-E0 de 18 compuestos tetrapirrólicos seleccionados en base a la semejanza estructural con el Tetrapirrol control y a la capacidad de inhibición mostrada previamente en el sistema de cribado masivo basado en priones recombinantes de topillo rojo. Tras la dilución 1:10¹ – 1:10⁸ de la semilla, se añadieron los compuestos a evaluar a una concentración final de 50 μM y todas las diluciones fueron sometidas a una ronda de PMSA de 24 h en las condiciones de PMSA óptimas establecidas previamente. Como control de la dilución máxima a la que propaga la semilla se incluyó una dilución con DMSO (vehículo en el que están disueltos los compuestos)

y como control de inhibición se incluyó una dilución con Tetrapirrol control a 50 μM. La capacidad de inhibición de un compuesto determinado se estableció en relación a la dilución máxima alcanzada en presencia de dicho compuesto y la dilución máxima alcanzada por el control DMSO. Los resultados se evaluaron mediante la medición por duplicado de los niveles de fibras amiloides en cada muestra utilizando espectrometría de fluorescencia con Tioflavina T (ThT) y se confirmaron mediante *Western Blot* con el anticuerpo D18 (1:5000). Los cuadrados negros indican aquellas diluciones en las que se ha detectado propagación. A la derecha (Inhibición vs DMSO), se indica la reducción de la propagación que cada compuesto provoca con respecto al control DMSO. En verde y agrupados, aquellos que muestran una alta capacidad de inhibición (reducción de 1000 veces o más de la propagación), en naranja aquellos con baja capacidad de inhibición (reducción de 10 – 100 veces de la propagación) y en rojo aquellos compuestos que no inhiben la propagación. 12 de los 18 compuestos testados muestran alta capacidad de inhibición, 5 presentan baja capacidad de inhibición y 1 no es capaz de inhibir la propagación de la semilla recombinante humana a diferencia del comportamiento con la semilla recombinante de topillo rojo. *: indica una discrepancia entre las medidas de ThT y *Western Blot* debido al fenómeno de desactivación fluorescente o *quenching*.

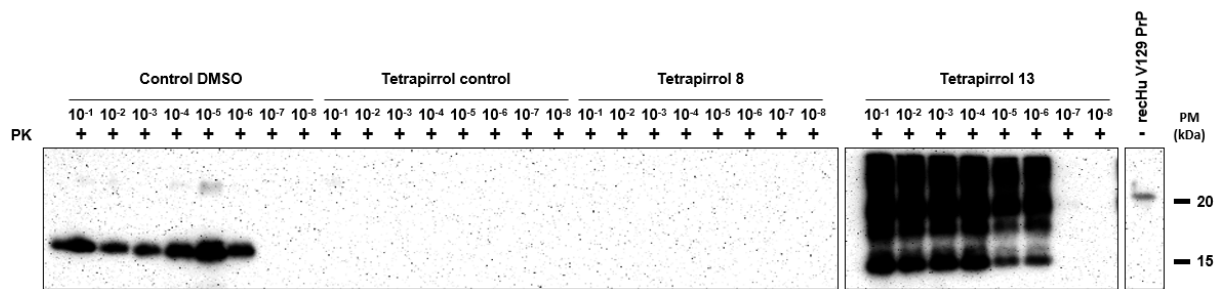


Figura 29. Capacidad de inhibición de la propagación de la PrP recombinante humana V-E0 del Tetrapirrol control, Tetrapirrol 8 y Tetrapirrol 13. *Western Blot* que muestra la inhibición de la propagación de la semilla V-E0 en presencia del Tetrapirrol control, Tetrapirrol 8 y Tetrapirrol 13 a 50 μ M representativos de los resultados obtenidos en la prueba de concepto resumida en la **Figura 28**. Se incluye también el control con DMSO, para mostrar la dilución máxima alcanzada por la semilla V-E0. Como recoge también la figura anterior, el Tetrapirrol 8 presenta una alta capacidad de inhibición, de 1×10^6 veces con respecto al control DMSO, mientras el Tetrapirrol 13 no es capaz de inhibir la propagación. PK: Proteinasa K; rec-Hu V129 PrP: sustrato recombinante humano V129 sin digerir.

7. Adsorción de las PrP recombinantes humanas malplegadas a partículas esféricas y desarrollo de un ensayo de cribado alternativo

La hidrofobicidad de las proteínas permite que estas puedan adsorberse a superficies de diferentes materiales. Durante esta tesis doctoral, se ha demostrado que la excesiva adsorción de rec-PrP a las partículas esféricas de vidrio, provoca una disminución de la concentración efectiva de rec-PrP en el tubo de PMSA, lo que lleva a una reducción en la eficiencia del malplegamiento espontáneo. Además, la capacidad de los priones para adsorberse a diferentes superficies ha sido ampliamente usada durante los últimos años para la detección y amplificación de los mismos, tanto en sistemas de propagación priónica como la PMCA o la RT-QuIC como en sistemas *in cellula*, demostrando además que los priones adsorbidos en la superficie de diferentes materiales retienen sus propiedades infecciosas [413-415]. Tras estas y otras observaciones llevadas a cabo en el laboratorio con priones recombinantes de otras especies, se testó la capacidad de adsorción de las rec-PrP^{res} humanas obtenidas mediante PMSA a las partículas esféricas de zirconio-sílice de 1.0 mm de diámetro utilizadas en los experimentos de propagación. El objetivo era comprobar si las rec-PrP^{res} adsorbidas en estas partículas mantenían su capacidad de transmitir su malplegamiento y se propagaban mediante PMSA. Esto permitiría usar las partículas esféricas con rec-PrP^{res} adsorbidas a modo de semilla en PMSA y otras técnicas de propagación de priones recombinantes tras un proceso de adaptación, lo que facilitaría la implementación de un sistema de cribado masivo en cualquier laboratorio.

7.1. Adsorción de las rec-PrP^{res} humanas a partículas esféricas de zirconio-sílice

Con el objetivo de adsorber las rec-PrP^{res} humanas a las partículas esféricas, se llevó a cabo la propagación de estas en presencia de partículas de zirconio-sílice de 1.0 mm, lavadas previamente para eliminar posibles impurezas. Dado que las partículas parecen intervenir en el proceso de

propagación, este procedimiento permite que la nueva rec-PrP^{res} se adhiera a las partículas tras la inducción de su malplegamiento. Las rec-PrP^{res} utilizadas como semilla se diluyeron 1:100 en sustrato fresco constituido por rec-PrP homóloga y se sometió a una ronda de PMSA de 24 h de duración y 700 rpm de agitación. El producto líquido de esta ronda se diluyó de nuevo 1:100 en sustrato fresco, pero en este caso se utilizaron las mismas partículas de la primera ronda de PMSA. Para obtener un mayor volumen tanto de material líquido como de partículas con rec-PrP^{res} adsorbida, se utilizaron 6 – 8 tubos idénticos por cada semilla evitando el uso de tubos de mayor tamaño con el fin de no modificar el formato de PMSA establecido para los priones recombinantes humanos. Tras cada ronda de PMSA se juntó el material de cada tubo y se homogeneizó para su utilización en una segunda ronda de PMSA. Para comprobar que había habido una correcta propagación, el material líquido de la segunda ronda de PMSA se digirió con PK. La tinción de proteínas totales del producto obtenido a partir de las cuatro semillas mostró una adecuada propagación (Figura 30 a), dado que cada una de las nuevas rec-PrP^{res} generadas mantuvieron su patrón electroforético característico. Para comprobar si las rec-PrP^{res} humanas se habían adsorbido a las partículas de zirconio-sílice se llevó a cabo una ronda de PMSA donde se usaron estas partículas como semillas. Previamente, las partículas se lavaron con PBS y H₂O estéril libre de nucleasas para eliminar cualquier posible resto de rec-PrP^{res} arrastrada con las partículas pero no adsorbida a ellas. Con el fin de semi-cuantificar la capacidad de propagación que tenía la rec-PrP^{res} V-E0 adsorbida a las partículas se utilizaron 1, 15 y 40 de estas y se sometieron a dos rondas de PMSA. Los resultados muestran que la proteína malplegada V-E0 se adsorbe eficientemente a las partículas esféricas de zirconio-sílice de 1.0 μm de diámetro y estas funcionan como semilla para su propagación. En este experimento se evidenció también que para obtener una propagación adecuada era necesario más de una partícula, dado que únicamente se observó un patrón electroforético adecuado cuando se utilizaron 15 y 40 partículas (Figura 30 b). Para determinar el número mínimo de partículas con las rec-PrP^{res} humanas adsorbidas necesario para malplegar la rec-PrP del sustrato en una sola ronda de PMSA, se realizó un experimento únicamente con 3 y 5 partículas. La Figura 31 muestra como en todos los casos se obtuvo propagación concluyendo que con un mínimo de 3 partículas esféricas utilizadas como semillas (se denominarán partículas esféricas adsorbidas de ahora en adelante) era suficiente para malplegar eficientemente la proteína recombinante en una sola ronda de PMSA.

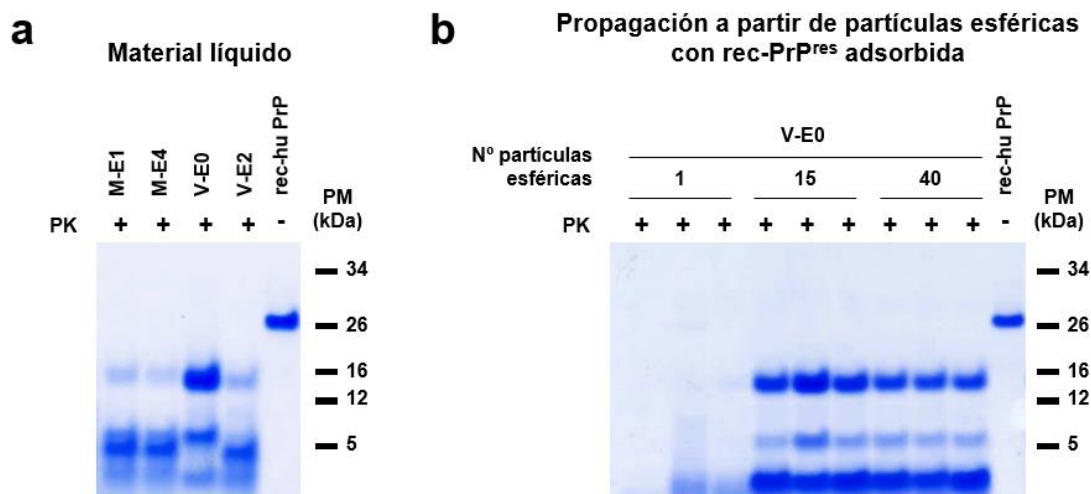


Figura 30. Estudio de la capacidad de propagación por PMSA de las partículas esféricas con PrP recombinante malplegada adsorbida en su superficie. **a)** Electroforesis y tinción de proteína total de las semillas recombinantes humanas M-E1, M-E4, V-E0 y V-E2 propagadas en 2 rondas seriadas de 24 h de PMSA a dilución 1:100 en las condiciones habituales (en presencia de partículas esféricas de zirconio – sílice de 1.0 mm, a 700 rpm y 39 °C). Se utilizaron las mismas partículas esféricas de zirconio-sílice en ambas rondas con el objetivo de obtener partículas esféricas con rec-PrP^{res} adsorbida en su superficie. La obtención de rec-PrP^{res} con el patrón de bandas electroforético característico de cada semilla tras la digestión del producto (material líquido) de la ronda 2 con 25 µg/ml de proteinasa K (PK), electroforesis y posterior tinción de proteína total indica una correcta propagación de cada una de ellas. **b)** Electroforesis y tinción de proteína total de los productos de PMSA obtenidos tras la utilización como semilla de las partículas esféricas con rec-PrP^{res} V-E0 adsorbida en su superficie. Se testó por triplicado la capacidad de 1, 15 y 40 partículas esféricas con rec-PrP^{res} adsorbida de malplegar 500 µl de sustrato recombinante humano V129 mediante una ronda de PMSA de 24 h a 700 rpm y 39 °C. El producto obtenido tras la ronda de PMSA se digirió con 25 µg/ml de PK y se evaluó la presencia de proteína malplegada mediante electroforesis y tinción de proteína total. Se observa que tanto 15 como 40 partículas esféricas con la semilla V-E0 adsorbida en su superficie son capaces de malplegar el sustrato recombinante. rec-Hu PrP: sustrato recombinante humano V129 sin digerir; PK: proteinasa K; PM: marcador de peso molecular.

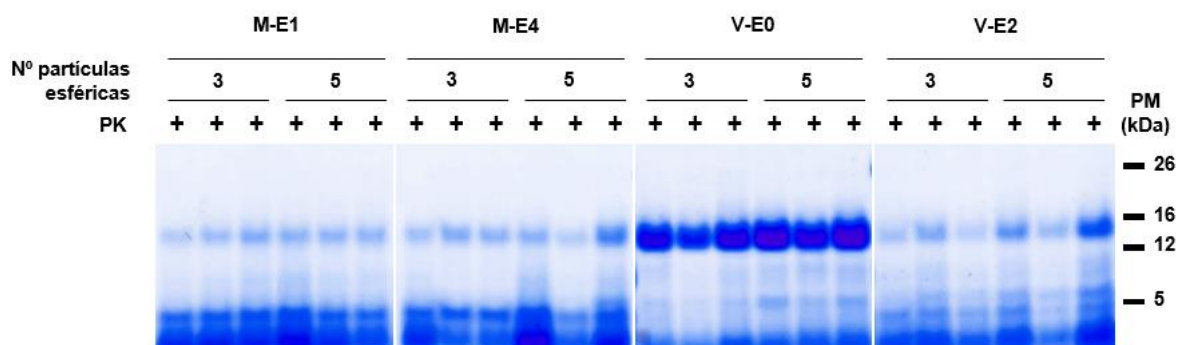


Figura 31. Estudio del número mínimo necesario de partículas esféricas con PrP recombinante malplegada adsorbida a su superficie para malplegar el sustrato recombinante por PMSA. Electroforesis y tinción de proteína total para evaluar la generación de rec-PrP^{res} mediante el uso como semilla de 3 o 5 partículas esféricas con las PrP recombinantes malplegadas M-E1, M-E4, V-E0 y V-E2 adsorbidas en su superficie. Las partículas esféricas se utilizaron como semilla de 500 µl de sustrato recombinante homólogo que se sometió a una ronda de PMSA de 24 h a 700 rpm y 39 °C. Tras la ronda de PMSA los productos obtenidos se digirieron con 25 µg/ml de proteinasa K (PK) y se llevó a cabo la electroforesis y tinción de proteína total. Cada cantidad de partículas esféricas se testó por triplicado. Los resultados muestran que tanto 3 como 5 partículas esféricas con cada una de las semillas recombinantes en su superficie fueron capaces de propagar en este nuevo formato de PMSA. PM: marcador de peso molecular.

7.2. Propagación mediante PMSA utilizando partículas esféricas adsorbidas como semillas a diferentes velocidades de agitación

Con el objetivo de caracterizar el nuevo sistema de cribado que se quería desarrollar utilizando como semillas las partículas esféricas adsorbidas con cada rec-PrP^{res} humana y determinar si existen diferencias entre las propiedades de cada una de ellas, se llevó a cabo una única ronda de PMSA a diferentes velocidades de agitación para estudiar el efecto de este parámetro sobre la propagación de cada una de las rec-PrP^{res} humanas adsorbidas. Además, otro de los objetivos era determinar la velocidad de agitación óptima para conseguir malplegar la proteína del sustrato utilizando una única partícula esférica adsorbida como semilla. Esto permitiría el desarrollo de un nuevo sistema de cribado de compuestos basado en un procedimiento versátil, de fácil implementación y con una alta reproducibilidad. Por ello se utilizaron 1 o 3 partículas esféricas adsorbidas con cada rec-PrP^{res} humana (condición control) y se llevó a cabo una única ronda de PMSA a 250, 500, 700, 1000 y 1200 rpm como velocidad de agitación. Tras la ronda de PMSA, el material de cada condición se digirió con PK y se visualizaron los resultados mediante la tinción de proteína total. Las velocidades de 250 y 500 rpm no fueron suficientes para conseguir la propagación con ninguna de las semillas ni cantidades de partículas utilizadas (Tabla 3). A una velocidad de agitación de 700 rpm y 1 partícula esférica, no se obtuvo propagación para ninguna de las rec-PrP^{res} humanas, a excepción de la rec-PrP^{res} humana V-E0. Sin embargo, a esta misma velocidad pero utilizando 3 partículas esféricas (condición control), todas las rec-PrP^{res} humanas propagaron en un único pase de PMSA. A velocidades mayores de agitación, se obtuvieron propagaciones tanto con 1 como con 3 partículas esféricas para todas la rec-PrP^{res} humanas (Tabla 3). El patrón de bandas observado mediante la tinción de proteína total se mantuvo respecto al de las semillas originales, lo que junto con el hecho de que las condiciones usadas en este formato no son las idóneas para el malplegamiento espontáneo de la rec-PrP humana, descartan prácticamente la posibilidad de que los resultados obtenidos se deban a la generación espontánea de rec-PrP^{res} humana. Por tanto, se determinó que una única partícula esférica adsorbida con cada rec-PrP^{res} humana es capaz de propagar a partir de 1000 rpm, excepto rec-PrP^{res} V-E0 que además indujo el malplegamiento a 700 rpm. En todos los casos donde se obtuvo rec-PrP^{res}, el 100% de las réplicas resultaron positivas, demostrando la alta reproducibilidad y la robustez de esta nueva metodología.

Tabla 3. Estudio del efecto de diferentes velocidades de agitación sobre la propagación por PMSA de las rec-PrP^{res} humanas adsorbidas en partículas esféricas. Utilizando como semilla 1 o 3 partículas esféricas con PrP recombinantes malplegadas (rec-PrP^{res}) humanas M-E1, M-E4, V-E0 o V-E2 en PMSA, se evaluó el efecto de la velocidad de agitación sobre la capacidad de malplegar el sustrato recombinante en una ronda de 24 h. Cada condición en estudio se testó por triplicado. En la tabla se indica el número de tubos positivos para rec-PrP^{res} (distintas intensidades de verde) evaluados mediante digestión con 25 µg/ml de proteinasa K (PK), electroforesis y tinción de proteína total.

	M-E1		M-E4		V-E0		V-E2	
	Part. esféricas		Part. esféricas		Part. esféricas		Part. esféricas	
	1	3	1	3	1	3	1	3
250 rpm	0	0	0	0	0	0	0	0
500 rpm	0	2	0	3	0	3	0	3
700 rpm	0	3	0	3	3	3	0	3
1000 rpm	3	3	3	3	3	3	3	3
1200 rpm	3	3	3	3	3	3	3	3

7.3. Propagación en rondas de PMSA de distinta duración utilizando partículas esféricas adsorbidas como semilla

Tras los resultados anteriores, se estableció que a una velocidad de agitación de 1000 rpm y tanto 1 como 3 partículas esféricas con rec-PrP^{res} adsorbida como semilla eran capaces de promover el malplegamiento de la rec-PrP humana. Por tanto, se estableció que para la nueva metodología de propagación priónica alternativa basada en partículas esférica adsorbidas, las condiciones óptimas se alcanzaban a 1000 rpm, dado que era la única velocidad de agitación que permitía la obtención de rec-PrP^{res} con una sola partícula esférica adsorbida como semilla. Sin embargo, para la prueba de concepto de la búsqueda de inhibidores mediante esta metodología se decidió establecer 1000 rpm como velocidad de agitación y 3 partículas esféricas adsorbidas como semilla como los parámetros idóneos, ya que esto aumentaría la fiabilidad del sistema y reduciría la variabilidad en caso de que alguna partícula esférica no hubiese adsorbido de forma adecuada rec-PrP^{res}, siendo incapaz de promover el malplegamiento del sustrato de forma eficiente, lo que podría llevar a la obtención de falsos positivos. No obstante, debido a que las partículas esféricas adsorbidas como semilla no permiten realizar diluciones seriadas para evaluar la eficiencia relativa de los potenciales compuestos inhibidores, se exploró la eficacia del nuevo sistema para malplegar el sustrato recombinante mediante una ronda de PMSA de distinta duración, ya que la capacidad discriminatoria otorgada por las diluciones seriadas podría sustituirse por rondas de PMSA a distintos tiempos. La propagación de priones, tanto *in vivo*

como *in vitro* es un proceso exponencial, que alcanza un *plateau in vitro* debido a la limitación de PrP en el sustrato. Dada la creciente eficiencia del proceso de malplegamiento a lo largo del tiempo, aquellos compuestos que consiguiesen inhibir la propagación priónica en una ronda de PMSA de 24 h de duración reflejarían una mayor capacidad de inhibición que aquellos que únicamente frenen la propagación priónica retrasando la aparición de rec-PrP^{res} detectable en rondas de PMSA de menor duración. Además, estudiar la cinética de propagación de esta nueva metodología basada en partículas esféricas con material adsorbido, podría permitir establecer rondas de PMSA más cortas, lo que implicaría una reducción del tiempo necesario para la detección de posibles compuestos anti-priónicos. Por ello, utilizando las condiciones establecidas, se llevó a cabo una única ronda de PMSA de 1, 2, 4, 6 y 24 horas de propagación. El material obtenido tras cada ronda de PMSA de distinta duración se digirió con PK y se realizó la tinción de proteína total. Los resultados mostraron que el tiempo mínimo necesario para obtener rec-PrP malplegada detectable utilizando partículas esféricas adsorbidas era de 6 h, ya que todas las partículas esféricas adsorbidas consiguieron propagar en el 100% de las réplicas realizada, salvo la rec-PrP^{res} V-E2, que presentó menor eficiencia de propagación a las 6 h ya que no se obtuvo rec-PrP^{res} en todas las réplicas, solo en el 50% de los tubos de PMSA (Figura 32). Los controles sin semilla, donde se añadieron tres partículas esféricas de zirconio-sílice de 1.0 mm pero sin rec-PrP^{res} adsorbida a su superficie muestran que no existe malplegamiento espontáneo de ambos tipos de sustrato recombinante humano. Por tanto, el rango de tiempo en el que se obtiene propagación priónica detectable con este tipo de semillas es de 6 – 24 h, lo que permitiría implementar un sistema de cribado capaz de discriminar la eficiencia de los potenciales compuestos utilizando PMSA de tres o cuatro tiempos, por ejemplo, de 4, 6, 12 y 24 h.

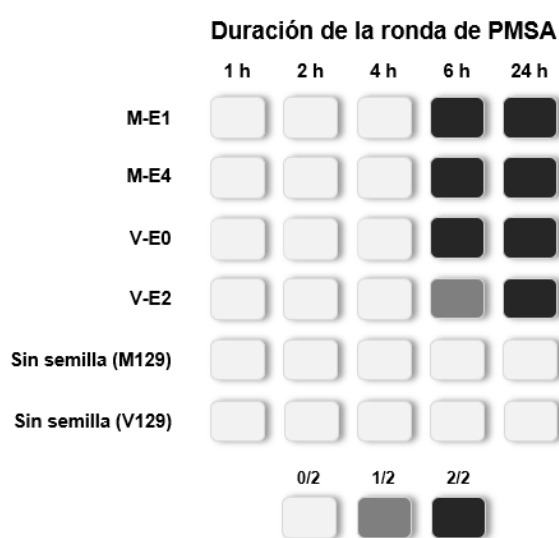


Figura 32. Evaluación de la capacidad de propagación de las partículas esféricas con PrP recombinantes malplegadas humanas adsorbidas en rondas de PMSA de distinta duración. Representación gráfica de la detección de PrP recombinante malplegado (rec-PrP^{res}) humana propagada en rondas de PMSA de distinta duración (1, 2, 4, 6 y 24 h) utilizando 1 partícula esférica con las semillas M-E1, M-E4, V-E0 y V-E2 adsorbidas en su superficie como semilla a 1000 rpm y 39 °C. Como control de la generación espontánea de rec-PrP^{res}, se incluyeron los dos tipos de sustrato recombinante humano utilizados (M129 y V129) con partículas esféricas de zirconio – sílice de 1.0 mm sin PrP recombinante malplegado en su superficie (Sin semilla (M129) y Sin semilla (V129)). Tras las rondas de PMSA de distinta duración, el producto se digirió con 25 µg/ml de proteinasa K (PK) y se evaluó la presencia de rec-PrP^{res} mediante electroforesis y tinción de proteína total. Cada condición se testó por duplicado. El número de tubos con rec-PrP^{res} detectable tras las rondas de PMSA se ha señalado con distintas intensidades de gris, tal y como se indica en la leyenda situada

en la parte inferior de la figura. Se observa que todas las semillas recombinantes humanas adsorbidas en partículas esféricas son capaces de malplegar el sustrato recombinante humano en rondas de PMSA de 6 h o más.

7.4. Prueba de concepto del sistema alternativo de cribado de compuestos anti-priónicos basado en partículas esféricas adsorbidas

Tras determinar el rango de tiempo en el que las semillas humanas recombinantes adsorbidas a la superficie de las partículas esféricas son capaces de inducir el malplegamiento de las rec-PrP humanas, decidimos testar la validez de este nuevo método de propagación para el cribado de compuestos con capacidad anti-priónica. Para ello, en primer lugar, se evaluó la capacidad de inhibir la propagación priónica del Tetrapirrol control y el Tetrapirrol 8 a una concentración final de 50 μM , dado que ambos mostraron una alta capacidad para inhibir la propagación priónica (1×10^6) a esta concentración mediante el sistema basado en diluciones seriadas. Utilizando tres partículas esféricas con rec-PrP^{res} V-E0 adsorbida como semilla, se llevaron a cabo rondas de PMSA a 1000 rpm con distinta duración, con el objetivo de detectar diferencias en la eficiencia de cada compuesto anti-priónico. Basándonos en los resultados previos, se decidió realizar rondas de PMSA de 6, 12 y 24 h. Como control de propagación priónica se incluyeron tubos con tres partículas esféricas adsorbidas y DMSO al 0.5% (v/v), y como control de la generación espontánea de rec-PrP^{res} o contaminación cruzada se incluyeron para cada tiempo de PMSA tubos con partículas esféricas sin rec-PrP^{res} en su superficie. Tras cada ronda de PMSA de distinta duración, el material obtenido se digirió con PK y se llevó a cabo la tinción de proteínas totales. Los resultados muestran que ambos compuestos tetrapirrólicos inhiben la propagación priónica a 6, 12 y 24 h (Figura 33), sin mostrar ninguna diferencia entre ellos.

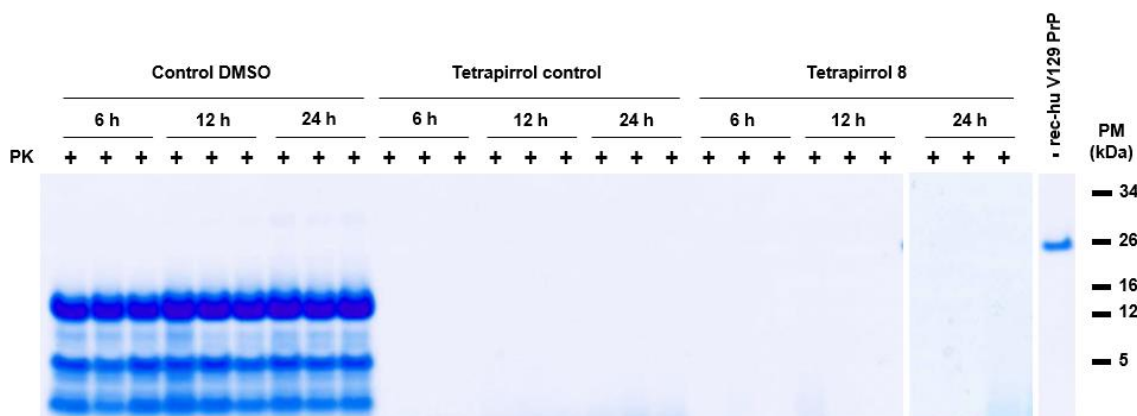


Figura 33. Estudio de la capacidad del sistema de propagación *in vitro* basado en partículas esféricas adsorbidas para detectar compuestos anti-priónicos. Electroforesis y tinción de proteína total donde se observa la capacidad de inhibir la propagación de las partículas esféricas adsorbidas utilizadas como semilla del Tetrapirrol control y el Tetrapirrol 8 (por triplicado), ambos con elevada actividad anti-priónica. Se utilizaron como semilla 3 partículas esféricas con la rec-PrP humana malplegada (rec-PrP^{res}) V-E0 adsorbida en su superficie y en presencia de 50 μM de cada compuesto, se llevó a cabo una ronda de PMSA de 6, 12 o 24 h a 1000 rpm y 39 °C. Como control de propagación se incluyeron muestras con DMSO (vehículo donde están disueltos los compuestos) sometidos a las mismas condiciones de PMSA. Tras la ronda de PMSA, el producto de cada una de ellas se digirió con 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteinasa K (PK) y se evaluó la presencia de rec-PrP^{res} mediante electroforesis y tinción de proteína total. Se observa que ambos compuestos son capaces de inhibir la propagación en PMSA independientemente de su duración, demostrando la capacidad del sistema de detectar compuestos con actividad anti-priónica. rec-Hu V29 PrP: sustrato recombinante humano V129 sin digerir; PM: marcador de peso molecular.

A continuación, en vista de los resultados obtenidos, se estudió el efecto de la concentración final del compuesto y el tiempo de la ronda de PMSA sobre la observación de diferencias en cuanto a la capacidad de inhibir la propagación priónica de ambos compuestos. Utilizando el mismo procedimiento experimental, se testaron el Tetrapirrol control y el Tetrapirrol 8 a una concentración de 10 μM , aplicando rondas de PMSA de 4, 6 y 12 h. Además, en paralelo se decidió testar la especificidad del sistema para detectar compuestos no inhibidores, por lo que se incluyó en este experimento el Tetrapirrol 13 (sin capacidad de inhibir la propagación priónica en diluciones seriadas) y un compuesto sin relación estructural con los tetrapirroles que aún no ha mostrado eficacia contra las EET humanas, la doxiciclina [377]. Estos dos nuevos compuestos se ensayaron a 50 μM y a 10 μM en las mismas condiciones que el Tetrapirrol control y el Tetrapirrol 8. De igual forma, se incluyeron controles de la propagación con DMSO y controles de espontaneidad y contaminación cruzada. La Figura 34 muestra una correcta propagación de los controles DMSO a todos los tiempos utilizados. Además, podemos observar que mediante una ronda de PMSA de 4 h, el Tetrapirrol control y el Tetrapirrol 8 inhiben el malplegamiento, por lo que una reducción tanto del tiempo de PMSA como de la concentración de ambos compuestos aún permitiría catalogarlos como compuestos anti-priónicos *in vitro*. Por el contrario, ninguno de estos compuestos inhibe completamente la propagación priónica en rondas de PMSA de 6 h de duración o más largas. Sin embargo, la señal de los fragmentos resistentes a proteasa es mucho más tenue que las correspondientes a las obtenidas con el control en las mismas condiciones de PMSA (Figura 34). Este resultado sugiere que este procedimiento permitiría semi-cuantificar la capacidad inhibitoria de los potenciales compuestos anti-priónicos. Y como demostración de este hecho, se puede observar la intensidad de la señal de los fragmentos obtenida después la ronda PMSA de 4 h, y deducir fácilmente como el Tetrapirrol 8 presenta una mayor capacidad de inhibición en comparación con la del Tetrapirrol control. Por otro lado, el testado del Tetrapirrol 13 y de la doxiciclina ha permitido establecer que esta nueva metodología es capaz de discriminar entre compuestos inhibidores y no inhibidores. La doxiciclina no inhibió la propagación priónica a ninguna concentración, en ninguna de las rondas de PMSA de distinta duración llevadas a cabo.

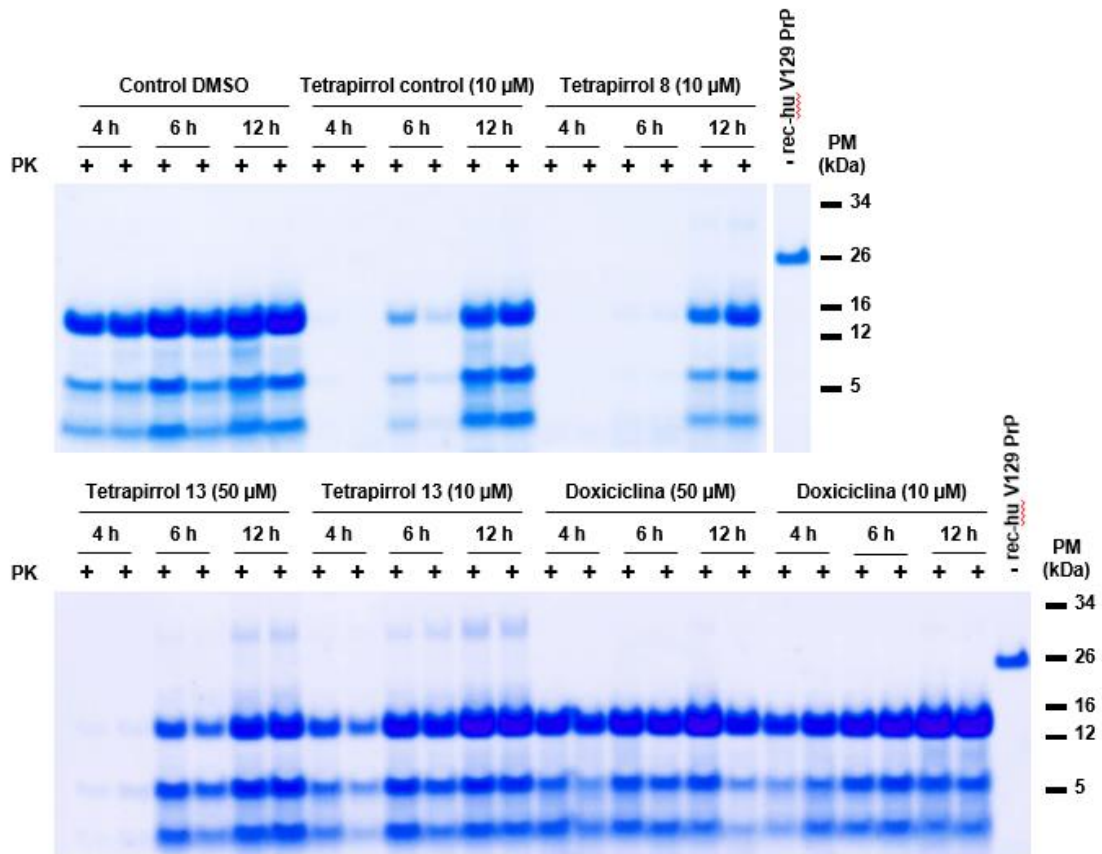


Figura 34. Estudio de la capacidad de discriminación entre compuestos con distinta capacidad anti-priónica del sistema de propagación *in vitro* basado en partículas esféricas adsorbidas. Electroforesis y tinción de proteína total que muestra la capacidad del Tetrapirrol control, Tetrapirrol 8, Tetrapirrol 13 y la doxiciclina a diferentes concentraciones de inhibir la propagación de 3 partículas esféricas con la semilla V-E0 adsorbida en su superficie en rondas de PMSA de 4, 6 y 12 h de duración a 1000 rpm y 39 °C. Como control de propagación se incluyeron tubos con DMSO (vehículo donde están disueltos los compuestos) sometidos a las mismas condiciones de PMSA. Todos los productos obtenidos en cada ronda de PMSA se digirieron con 25 µg/ml de proteinasa K (PK) y se evaluó la presencia de PrP recombinante malplegada (rec-PrP^{res}) humana mediante electroforesis y tinción de proteína total. Cada condición se ensayó por duplicado. La concentración final testada de cada compuesto se indica entre paréntesis. Se observa que el Tetrapirrol control y el Tetrapirrol 13 (alta capacidad anti-priónica en diluciones seriadas) son capaces de inhibir la propagación en la ronda de PMSA de 4 h, pero solo el Tetrapirrol 8 es capaz de mostrar actividad anti-priónica en rondas de mayor duración. El Tetrapirrol 13 (sin capacidad anti-priónica en diluciones seriadas) es capaz de inhibir la propagación en la ronda de PMSA de 4 h a 50 µM pero no a 10 µM. La doxiciclina (compuesto que no ha mostrado eficacia contra las EET humanas en ensayos clínicos) no es capaz de inhibir la propagación *in vitro* en ninguna de las condiciones estudiadas. rec-Hu V29 PrP: sustrato recombinante humano V129 sin digerir; PM: marcador de peso molecular.

Por el contrario, el Tetrapirrol 13 solo inhibió pero de forma incompleta la propagación priónica a 50 µM y mediante una ronda de PMSA de 4 h, siendo incapaz de mostrar capacidad anti-priónica en rondas de PMSA de mayor duración o a menor concentración (Figura 34). Por todo ello, se puede concluir que esta nueva metodología para el cribado de compuestos con potencial anti-priónico presenta una gran sensibilidad para detectar compuestos con alto potencial inhibitor y también aquellos con menor potencial gracias al uso de rondas de PMSA de duración variable. Por último, los resultados también se evaluaron mediante espectrometría de fluorescencia y ThT con el fin determinar la capacidad de este método más sencillo y rápido para evaluar la inhibición ejercida por un compuesto

usando esta nueva metodología. La Figura 35 muestra que los resultados obtenidos mediante ThT y los obtenidos mediante digestión con PK y tinción de proteína total son similares, quedando establecida la posibilidad de monitorizar los resultados también mediante este método.

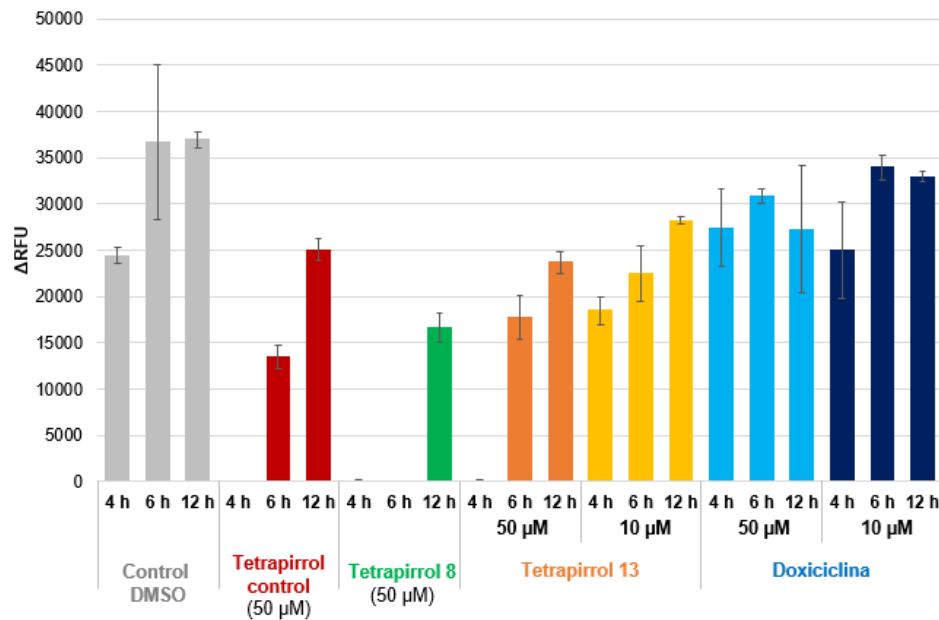


Figura 35. Detección mediante espectrometría de fluorescencia con Tioflavina T de los resultados obtenidos con el sistema de propagación *in vitro* basado en partículas esféricas adsorbidas. Representación gráfica de los niveles de fibras amiloides detectadas por espectrometría de fluorescencia con Tioflavina T (ThT) de las mismas muestras que las de la **Figura 34**. Tras las rondas de PMSA de distinta duración en presencia de Tetrapirrol control, Tetrapirrol 8, Tetrapirrol 13 y la doxiciclina diferentes concentraciones, se evaluó la capacidad de inhibir la propagación de la semilla V-E0 adsorbida en partículas esféricas con respecto al control DMSO, mediante espectrometría de fluorescencia con ThT con el objetivo de establecer la validez de este método para monitorizar los resultados de esta metodología alternativa para el cribado de compuestos con potencial anti-priónico. Cada muestra se midió por duplicado. Para discriminar entre muestras positivas para fibras amiloides y muestras negativas se define el umbral de corte como la media de RFU de 4 tubos con sustrato recombinante humano con 3 partículas esféricas sin semilla adsorbida a su superficie y sometidos a PMSA, más tres veces su desviación estándar. Se representa la media de todos los tubos de una misma condición medidos por ThT por duplicado y las barras de error indican la desviación estándar. Se puede observar que los resultados obtenidos mediante este método de detección son iguales a los obtenidos mediante digestión con proteinasa K (PK), electroforesis y tinción de proteína total mostrados en la **Figura 34**.

DISCUSIÓN

Uno de los retos más importantes al que se enfrenta la comunidad científica en relación a las EET humanas, sino el que más, es la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas frente a estas patologías, para las que aún no existe un tratamiento efectivo alguno [333]. Los tratamientos disponibles en la actualidad están enfocados en aliviar los síntomas derivados del daño neurológico, como el uso de anticonvulsivos. Por ello, aunque no se trate de un tratamiento curativo, el desarrollo de terapias que modifiquen el curso de la patología, aumentando la esperanza de vida junto con un mantenimiento de la calidad de vida de los pacientes es de vital importancia [341]. Se han explorado numerosas vías para alcanzar esa tan deseada opción terapéutica, algunas de las cuales como la doxiciclina, la quinacrina, la flupirtina o el pentosan polisulfato se han llegado a probar en ensayos clínicos. Sin embargo, desafortunadamente solo la doxiciclina se encuentra actualmente en fase de ensayo clínico, mientras que los demás compuestos han fallado al no proporcionar mejoras significativas en los afectados [369]. Existen varias razones que explican el fracaso de los ensayos clínicos realizados hasta la fecha. En primer lugar, la falta de un diagnóstico precoz y certero para las diferentes EET humanas, unido al rápido progreso de la enfermedad, implica que la gran mayoría de los pacientes sean diagnosticados en etapas avanzadas de la misma, donde el deterioro cognitivo es severo. Sin embargo, diferentes estudios en modelos animales infectados con priones muestran como la eficacia del compuesto aumenta si se administra en fases tempranas de la enfermedad o de forma profiláctica, siendo ineficaz en etapas avanzadas de la misma [354, 381, 416]. Por ejemplo, uno de los compuestos en los que las etapas de la enfermedad en la que se administra han sido ampliamente estudiadas, el IND24, incrementó cuatro veces el tiempo de aparición de los signos clínicos de la enfermedad cuando se administró de forma profiláctica y aproximadamente un 70% el tiempo de supervivencia de los animales infectados con priones cuando se administró antes de la aparición de los signos clínicos. Por el contrario, no mostró eficacia alguna cuando se administró después de la aparición de los primeros signos clínicos [381]. Es importante destacar que la mayoría de los ensayos clínicos donde se han utilizado compuestos potencialmente anti-priónicos han sido de tipo observacional, con un número reducido de pacientes que además se encontraban en etapas avanzadas de la enfermedad. Solo la quinacrina, la doxiciclina y la flupirtina han sido probadas en ensayos clínicos controlados y aleatorizados, pero también con pacientes que presentaban síntomas avanzados de la enfermedad [369]. El ensayo clínico que se está desarrollando actualmente con la doxiciclina es el primero que se realiza en formato de ensayo clínico preventivo, donde una parte de los individuos que forman parte de él presentan la mutación genética que predispone al desarrollo de FFI, sin presentar aún signos de la enfermedad [375]. En segundo lugar, se ha observado que las diferentes cepas priónicas podrían estar sometidas a procesos de selección y/o adaptación en respuesta a los cambios

en el ambiente en el que se encuentran. Para explicar este fenómeno hay que recurrir a una de las hipótesis que actualmente tiene más seguidores y que plantea la existencia de “sub-cepas” o “cuasi-especies” que actuarían como variantes conformacionales dentro de una misma cepa. Cualquier cambio que redunde en la capacidad de propagación diferencial entre estas variantes conformacionales, llevará a la selección de aquellos conformeros que son biológicamente más estables dentro de una misma cepa, en el nuevo ambiente en el que se encuentren [417-420]. Así, se ha demostrado que la administración de un compuesto anti-priónico en animales infectados con una cepa priónica determinada puede inducir la aparición de conformeros alternativos resistentes al tratamiento [380, 421, 422]. Este fenómeno de aparición de nuevas variantes estructurales resistentes al compuesto anti-priónico en estudio permite a los priones disponer de una estrategia para sobrevivir en un ambiente desfavorable. Esto dificulta la búsqueda de terapias efectivas contra las EET humanas y explicaría la ineficacia de ciertos compuestos al ser testados en modelos animales o en ensayos clínicos. Por último, la existencia de cepas priónicas lleva también a que ciertos compuestos que son efectivos contra determinadas cepas no lo sean frente a otras, pudiendo llegar incluso a promover la propagación de alguna de estas cepas priónicas, como el caso de la quinacrina y la CWD [423]. En este sentido, Berry y colaboradores determinaron que la eficacia del compuesto IND24 y algunos de sus derivados dependían de la cepa priónica en estudio, mostrando capacidad de prolongar el tiempo de incubación en ratones infectados con las cepas RML y ME7, pero siendo ineficaces contra priones humanos de tipo sCJD MM1 [381]. Otro ejemplo muy estudiado es el de la quinacrina, la cual mostró una gran eficacia en modelos celulares infectados con priones de scrapie adaptados a ratón [424] pero fue completamente ineficaz cuando se testó en humanos [425]. Una posible alternativa para solventar alguno de estos problemas se basa en la terapia combinada. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que el uso combinado de IND24 y Anle138B, dos compuestos con limitada capacidad anti-priónica, no fue más efectivo que el uso individual de ambos. Además, se observó la aparición de PrP^{Sc} resistente a la terapia combinada [422]. Al igual que en la mayoría de los estudios con fines terapéuticos, para este estudio se utilizó un modelo murino infectado con una cepa priónica derivada de scrapie. Por tanto, teniendo en cuenta todos los factores anteriormente explicados, los resultados obtenidos en los diferentes modelos murinos podrían no ser extrapolables a EET humanas.

La ausencia de modelos celulares y la dificultad para modelar la enfermedad en animales para el estudio de EET humanas dificulta en gran parte la búsqueda de compuestos anti-priónicos. La gran mayoría de las líneas celulares desarrolladas para el estudio de las enfermedades priónicas se basan en priones murinos y son muy restrictivos en lo referente a su capacidad de propagar distintas cepas. Todos los intentos para desarrollar un modelo celular enfocado al estudio de cepas priónicas humanas han fracasado [88]. De forma similar, a pesar de la gran diversidad de modelos de ratón transgénicos

desarrollados que expresan PrP^C humanas, ya sean de tipo WT o con mutaciones asociadas a patología, su utilidad para el estudio de estrategias terapéuticas es limitada [426]. Por un lado, aquellos modelos que no presentan sobreexpresión no desarrollan la enfermedad en el corto periodo de vida de un ratón al ser inoculados intracerebralmente con cepas humanas, requiriéndose niveles muy elevados de PrP^C y haciendo que su respuesta a compuestos anti-priónicos sea peor. Por otro lado, ni siquiera los modelos murinos con sobreexpresión o los que expresan PrP^C con mutaciones asociadas a EET humanas genéticas muestran una adecuada susceptibilidad a la inoculación con aislados de carácter homólogo, salvo contadas excepciones [88, 288, 427]. Todo esto, además de dificultar mucho el estudio de la potencial eficacia de los compuestos encontrados mediante cribados basados en técnicas *in vitro* e *in vivo*, podría ser uno de los principales motivos del fracaso de la mayoría de estos tras su testado en la variedad de modelos *in vitro*, *in cellula* e *in vivo* disponibles. Es necesario, por tanto, un esfuerzo extra para conseguir establecer una línea celular capaz de propagar de forma persistente una cepa priónica humana o para conseguir modelos animales que recapitulen de forma fidedigna las EET humanas esporádicas, lo que permitiría llevar a cabo el testado de nuevas aproximaciones terapéuticas en sistemas específicos para EET humanas.

Por otro lado, con los sistemas de propagación *in vitro* ocurre algo similar; la mayoría de los sistemas que han sido utilizados para la búsqueda de compuestos no se basan en priones humanos o no recapitulan las principales características de un prion *bona fide in vivo*, como en el caso de la RT-QuIC, una técnica muy útil para la detección de proteínas malplegadas pero que no da lugar a una propagación priónica como la que tiene lugar *in vivo* [325], limitando la utilidad de estos sistemas para la búsqueda de compuestos terapéuticos.

Dada la imposibilidad actual de superar el desconocimiento de los mecanismos moleculares que impide diseñar terapias de forma racional, los esfuerzos de un gran número de investigadores se están centrando en la búsqueda masiva de nuevos compuestos químicos con potencial para convertirse en un futuro tratamiento contra las EET humanas utilizando todos estos modelos imperfectos [428]. En este sentido, una de las vías de investigación más explotadas es la identificación de compuestos con capacidad de inhibir la propagación priónica en sistemas *in vitro* e *in cellula* a partir de librerías químicas [326, 386]. A pesar de haberse identificado decenas de compuestos con actividad anti-priónica, el fracaso al trasladarlos a la práctica clínica [385] refleja lo importante que es continuar en el descubrimiento de nuevos compuestos con potencial anti-priónico mediante el uso de sistemas lo más cercano posible a la realidad de las EET humanas. La detección de nuevas moléculas permitirá describir nuevos farmacóforos que posibilitarán el estudio y desarrollo de nuevas estructuras mediante química médica, así como el diseño de terapias que combinen compuestos con distintos mecanismos de acción. En este sentido, nuestro laboratorio ha desarrollado recientemente una nueva

metodología para la propagación de priones *in vitro* denominada PMSA, la cual permite la obtención de grandes cantidades de priones recombinantes altamente homogéneos e infecciosos *in vivo* [330]. La gran versatilidad de esta metodología ha permitido su adaptación posterior en el cribado masivo de compuestos con posible actividad anti-priónica. El nuevo sistema de cribado permitió testar una biblioteca de más de 2000 compuestos químicos, entre los que se detectaron tres nuevas moléculas inhibidoras de la propagación priónica *in vitro* [332]. Sin embargo, la caracterización de estos tres compuestos, denominados L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85, mediante sistemas de propagación priónica *in vitro* alternativos, como la PMCA y el modelo celular ScN2a infectado con la cepa priónica RML, determinó que presentaban especificidad de especie, remarcando de nuevo la necesidad de realizar el cribado en un sistema *in vitro* basado en la especie en estudio. Al estudiar la capacidad de inhibición de estos tres compuestos mediante PMCA basada en sustratos con PrP recombinantes o de origen encefálico de diferentes especies, se observó una importante variación en la eficacia anti-priónica de los tres compuestos (Tabla 2). La diferencia en la capacidad de inhibición en función de la especie se podría explicar basándose en una mayor afinidad que presentan estos compuestos por la rec-PrP o por la semilla utilizada de cada especie. Así, a pesar de que no se conoce el mecanismo por el cual estos compuestos bloquean la propagación priónica, los estudios preliminares realizados han indicado que los tres compuestos se unen a la PrP^C humana (resultados pendientes de publicación). Por tanto, teniendo en cuenta dicha unión, se puede hipotetizar que un posible mecanismo de acción consista en el impedimento de la interacción PrP^C – PrP^{Sc} o a través de la estabilización de la conformación nativa de la PrP^C, dificultando su malplegamiento [385]. Esta última hipótesis, permitiría explicar la especificidad de especie de ciertos compuestos debido a la mayor afinidad por la PrP^C de una especie frente a la de otra. Sin embargo, si asumimos que el mecanismo se basa en obstaculizar la interacción PrP^C – PrP^{Sc}, si las diferentes cepas priónicas de una misma especie presentan distintas regiones de interacción con la PrP^C de la especie en cuestión, el sitio de la PrP^C al que se une el compuesto anti-priónico podría explicar la especificidad de cepa, ya que podría unirse a una región de la PrP^C inadecuada que no permitiera interferir en la interacción con la PrP^{Sc}. No obstante, debido a que se desconoce si los compuestos podrían unirse a su vez a la PrP^{Sc}, no podemos obviar que los mecanismos responsables de la especificidad de especie y cepa podrían ser totalmente distintos a los planteados aquí. Por todo ello, se podría concluir que la utilización de sistemas de cribado *in vitro* basados en proteínas recombinantes de otras especies o limitados a una sola cepa podría implicar la no detección de compuestos con actividad anti-priónica específica contra determinadas EET humanas. Y es por ello por lo que uno de los objetivos principales de esta tesis doctoral se ha enfocado en el desarrollo de un sistema *in vitro* que permita la obtención de un panel de priones recombinantes humanos y la posterior adaptación de estos a un sistema de cribado para la búsqueda de compuestos anti-priónicos específicos contra las EET humanas.

Los mismos estudios que determinaron la especificidad de los tres compuestos detectados mediante PMSA basada en topillo rojo, revelaron a su vez el dato sorprendente de la baja o nula capacidad de inhibir la propagación priónica de algunos de estos compuestos por PMCA basada en un sustrato recombinantes de topillo rojo complementado con homogeneizado KO-PrP. Esto se podría explicar debido a la presencia de cofactores encefálicos en el sustrato de PMCA aportados al añadir el homogeneizado KO-PrP. La presencia de una gran variedad de moléculas podría reducir la capacidad anti-priónica de estos compuestos debido a que estos podrían unirse también a otros elementos presentes en el encéfalo, reduciendo su interacción con la rec-PrP de topillo rojo. Aun así, el compuesto L2.JM33, a pesar de encontrarse en un ambiente encefálico, disminuyó la propagación priónica 1000 veces probablemente por presentar una elevada afinidad por la rec-PrP humana. Por otro lado, el compuesto L2.JM85 parece mostrar una elevada especificidad por la PrP de oveja, dado que únicamente es capaz de inhibir la propagación priónica de dicha especie en PMCA. Por el contrario, el compuesto L2.JM56 muestra la capacidad de inhibición priónica más elevada, dado que inhibe más de 1×10^5 veces la propagación en todos los sustratos recombinantes usados en PMCA. En términos generales, los tres compuestos vieron reducida su capacidad anti-priónica cuando se testaron en PMCA basada en homogeneizados de encéfalos de diferentes especies, a excepción de los compuestos L2.JM56 y L2.JM85 con el sustrato basado en homogeneizados de encéfalos de modelos murinos que sobreexpresan PrP^C de oveja. Además de contener todos los cofactores presentes en el encéfalo, este tipo de sustrato está formado por PrP^C en lugar de rec-PrP. Las diferencias entre ambos tipos de PrP (ausencia de GPI y de glicosilación en la rec-PrP) podría ser la causa de las diferencias observadas. Un estudio de la interacción de estos compuestos con distintas rec-PrP mediante RMN aclararía si las perturbaciones debidas a la unión con los compuestos se dan en regiones cercanas donde se acoplan las glicosilaciones o al GPI. Con todo, la gran afinidad por otras moléculas presentes en el encéfalo, la diferencia de afinidad para la PrP^C y la rec-PrP, y los diferentes comportamientos observados entre los tres compuestos, respaldan el objetivo principal de este trabajo: la necesidad de desarrollar un sistema *in vitro* para el cribado de compuestos específicos para la PrP humana.

El primer requisito para el desarrollo de un sistema de cribado masivo *in vitro* específico para EET humanas, es la obtención de un prion humano idóneo para el sistema de propagación priónica en el que se basará. Debido al reciente desarrollo de la PMSA para la propagación de priones recombinantes de topillo rojo en nuestro laboratorio y a su exitosa adaptación a la búsqueda de compuestos anti-priónicos, esta metodología *in vitro* fue la seleccionada para tal propósito. Además de ser capaz de replicar las características de un prion *bona fide*, la PMSA presenta una serie de ventajas con respecto a las demás técnicas de propagación *in vitro* existentes. La sencillez del equipo necesario para su aplicación, así como una gran simplicidad del sustrato, permiten que pueda ser implementada en

prácticamente cualquier laboratorio. Además, la composición del sustrato, basado únicamente en rec-PrP, detergente, sales y dextrano sulfatado permite monitorizar los resultados mediante fluorimetría mediada por ThT, lo que favorece la automatización del proceso y reduce las limitaciones asociadas a las técnicas de *immunoblotting*. Por otro lado, esta nueva metodología de propagación, gracias al uso de un cofactor específico como el dextrano sulfatado, parece limitar la heterogeneidad estructural de los priones propagados *in vitro* [330]. Este comportamiento difiere del de la PMCA donde el uso de homogeneizados de encéfalos favorece la generación de rec-PrP^{res} con propiedades biológicas variables, probablemente debido a la formación de material estructuralmente heterogéneo [258]. Además, los priones recombinantes de topillo rojo obtenidos en presencia de dextrano sulfatado tanto en PMCA como en PMSA fueron altamente infecciosos en el modelo natural de topillo rojo, dato que ratificó la decisión de adaptar esta metodología al uso rec-PrP humana. Por último, una de las propiedades de la PMSA que también se valoró a la hora de su elección como sistema para el desarrollo de esta tesis doctoral fue su capacidad de generar grandes volúmenes de rec-PrP^{res} recombinante homogénea, dado que permitiría aumentar en gran medida el número de compuestos a ser testados de una forma rápida y con pocas limitaciones.

Una vez seleccionado el sistema *in vitro* de propagación, la primera estrategia que se exploró para la obtención de priones recombinantes humanos aptos para su propagación por PMSA fue el uso de cepas esporádicas humanas de origen encefálico para inducir el malplegamiento en un sustrato recombinante. El objetivo era replicar las características de un prion propagado previamente en un encéfalo en el formato de PrP recombinante, con el fin de obtener priones recombinantes *bona fide*. Los estudios realizados mediante PMCA con sustratos basado en PrP^C han demostrado que esta técnica puede propagar diferentes cepas priónicas humanas con distinta eficiencia, siendo la más eficiente la cepa de tipo vCJD (tipo IV) [312, 429]. Por el contrario, la PMCA presenta una menor eficiencia a la hora de propagar cepas esporádicas o con origen genético (tipo I y tipo II). Debido a que la patología esporádica es la más frecuente dentro de las EET humanas y a que la eficacia de un futuro compuesto anti-priónico puede verse afectada por el tipo de cepa priónica presente en el individuo afectado, se seleccionaron cuatro cepas distintas de sCJD para esta primera estrategia. La selección de estas cepas responde a la necesidad de representar la variabilidad existente dentro de las enfermedades priónicas esporádicas [430]. A diferencia de los resultados obtenidos en nuestro laboratorio para otras especies, esta estrategia no fue efectiva para la generación de priones recombinantes humanos. Solo la cepa sCJD MV2 generó material resistente a PK cuando se utilizó el sustrato rec-Hu V129 PrP a partir de la ronda 2 de PMSA. Sin embargo, este material no mantuvo la capacidad de propagación de forma indefinida en las rondas seriadas de PMSA aplicadas para estudiar su estabilidad. Esto nos llevó a cuestionar la naturaleza del material resistente obtenido, dado que probablemente se tratara de

material agregado con resistencia parcial a la digestión por proteasas en lugar de rec-PrP^{res} con propiedades de un prion *bona fide*. La aparición de fragmentos de bajo peso molecular (~5 kDa o menores) y la desaparición de la banda de ~16 kDa, que representa al principal producto de la digestión por PK de la rec-PrP^{res} habitualmente, es otro de los indicios que apuntan en esa dirección. Es importante destacar que los fragmentos de bajo peso molecular se originan frecuentemente en el sustrato rec-Hu V129 PrP, tanto en reacciones de PMSA sin semilla (espontáneas) como con semilla, incluso cuando la semilla no propaga en ninguna de las rondas de PMSA, como el caso de la semilla sCJD VV1. Por el contrario, no se han observado fragmentos de bajo peso molecular en las reacciones de PMSA con el sustrato rec-Hu M129 PrP, ni en las reacciones de PMSA espontáneas ni con semilla. Por tanto, hipotetizamos que la rec-PrP humana con el polimorfismo V129 presenta propiedades particulares que inducen la formación de agregados de bajo peso molecular resistentes a PK, lo que podría generar la aparición puntual de bandas de mayor tamaño resistentes a PK, no siendo consecuencia por tanto de la inducción del malplegamiento por parte de la semilla utilizada. Esta característica también se ha observado en otros experimentos independientes donde se usó sustrato rec-Hu V129 PrP, apuntando en la misma dirección.

La incapacidad de las semillas encefálicas humanas de propagar mediante esta nueva metodología podría explicarse debido a la baja cantidad de PrP^{Sc} en las muestras y a la interacción de los componentes encefálicos con el sustrato de PMSA. Por ello, antes de incorporarlo como inóculo a la PMSA, la semilla sCJD MV2 se purificó mediante un colchón de sacarosa, con dos objetivos: concentrar las moléculas de PrP^{Sc} de la muestra y eliminar algunos de los componentes encefálicos que pudiesen interferir en la propagación priónica. Sin embargo, a la luz de los resultados obtenidos, esta estrategia tampoco permitió la propagación de dicha cepa priónica en el sustrato recombinante. La reducción de cofactores presentes de forma natural en el encéfalo mediante este método de concentración pudo haber provocado una reducción de la capacidad de propagación de las semillas encefálicas, ya que el papel de los cofactores en la propagación de priones mediante PMCA está bien establecido [258, 431]. Alternativamente, la centrifugación realizada para concentrar la PrP^{Sc} presente en la muestra puede llevar a una compactación de las mismas y a la selección de los agregados de mayor tamaño, cuya capacidad de propagación parece ser más reducida [155], resultando en la no propagación sobre la rec-PrP, que ya estaría impedida por las diferencias en las glicosilaciones y el anclaje a membrana. Por ello, se descartó la estrategia de concentración y se probó la estrategia contraria basada en la utilización de diluciones mayores de la semilla (1:10³ en lugar de 1:10¹), con el fin de alcanzar un compromiso entre reducir la cantidad de moléculas inespecíficas del encéfalo que pudieran interferir en la propagación y mantener los cofactores necesarios para una propagación eficiente. Esta aproximación experimental ha sido exitosa a la hora de propagar semillas encefálicas de otras especies,

como topillo rojo, ciervo y ratón (resultados no publicados). Sin embargo, de nuevo, los resultados mostraron que las semillas humanas utilizadas no indujeron el malplegamiento de la rec-PrP humana mediante PMSA.

El material generado mediante el uso de la cepa humana sCJD MV2 no reunía las características adecuadas para ser utilizado en un sistema de cribado de compuestos, ya que no presentaba capacidad de propagación de forma indefinida, por lo que se descartó su uso. Por ello, ante la dificultad para malplegar la rec-PrP de ambos polimorfismos por PMSA utilizando semillas de origen encefálico, se exploraron otras vías como la generación espontánea mediante PMSA. Durante los últimos años se ha llevado a cabo un proceso de optimización de la PMSA en nuestro laboratorio que ha permitido el malplegamiento espontáneo de rec-PrP de diferentes especies: topillo rojo, oveja, ciervo y ratón (resultados pendientes de publicar). Este procedimiento es análogo al proceso de obtención espontánea que tiene lugar en PMCA [98, 258, 432]. La generación espontánea de dichos priones mediante PMSA con alta eficiencia y reproducibilidad sugirieron que podría ser una buena estrategia para aplicar a otras especies para las que se quisiera obtener priones recombinantes *bona fide*. Además, conseguir el malplegamiento espontáneo de rec-PrP de topillo rojo en una única ronda de PMSA utilizando dextrano sulfatado que limita la heterogeneidad estructural, permite la obtención de rec-PrP^{res} más homogéneas, a diferencia de lo que ocurre en PMCA complementada con homogeneizado de encéfalo [258]. No menos importante es la posibilidad de que los priones recombinantes obtenidos de forma espontánea mimeticen de forma más precisa a las cepas responsables de las EET humanas esporádicas. Por eso, se valoró positivamente esta estrategia, basada en el mismo principio por el que se valoró el uso de semillas encefálicas de sCJD. Además, con el objetivo de favorecer el malplegamiento espontáneo, se utilizó como sustrato la rec-PrP humana con la mutación I109 de topillo rojo a pesar de que no es una variante polimórfica natural en humanos. Sin embargo, se ha demostrado que esta variante es la responsable de la elevada propensión de la PrP de topillo rojo al malplegamiento, tanto *in vivo* como *in vitro* [91, 258], llegándose a proponer a este modelo animal como un aceptor universal de priones [410]. Esta estrategia de utilizar una proteína a priori más susceptible al malplegamiento para conseguir un prion recombinante humano con una única diferencia aminoacídica permitía determinar si la rec-PrP humana podía malplegarse o no. No conseguir el malplegamiento de la rec-PrP humana I109 podría indicar una fuerte restricción o imposibilidad para malplegar cualquier rec-PrP humana (variantes alélicas naturales o con mutaciones artificiales). Sin embargo, gracias a rondas sucesivas de PMSA con las condiciones óptimas para la obtención de rec-PrP^{res} espontánea de topillo rojo se consiguió malplegar rec-PrP humanas con la mutación I109. Desafortunadamente, aplicando el mismo procedimiento, no se consiguieron malplegar las isoformas WT de la rec-PrP humana. Estos resultados iniciales dejaron patente que el

malplegamiento de las rec-PrP WT humanas iba a requerir de un proceso de optimización de la PMSA adapta a este tipo de proteínas. El experimento con las rec-PrP humanas mutadas también reveló que la eficiencia del malplegamiento espontáneo era diferente para cada tipo de proteína. Esto podría deberse a la influencia del polimorfismo del codón 129, además de a la variabilidad intrínseca o a la alta estocasticidad de los procesos de malplegamiento espontáneos [433]. Con todos estos datos previos, el objetivo se centró en generar de forma espontánea priones recombinantes humanos WT a través de la optimización de la PMSA. Para ello, los parámetros sobre los que se puede actuar son la concentración de rec-PrP en el sustrato, el tipo y velocidad de agitación, el tamaño y material de las partículas esféricas utilizadas y la temperatura [330]. El estudio del efecto de cada uno de estos parámetros (a excepción de la temperatura que se fijó en 39°C) así como su modificación acorde, resultó en la consecución de una PMSA optimizada que conseguía de forma sistemática el malplegamiento de las rec-PrP humanas WT. El primer parámetro evaluado fue la concentración de rec-PrP en el sustrato. La idea de que una mayor concentración de rec-PrP en el sustrato final podría aumentar la eficiencia del malplegamiento espontáneo se sustentó sobre la experiencia de nuestro laboratorio en la obtención de priones recombinantes espontáneos mediante PMSA, donde una mayor concentración de rec-PrP (hasta alcanzar un límite máximo) aumenta la eficiencia del malplegamiento espontáneo de rec-PrP de otras especies. Además, es necesaria una concentración mínima para mantener la eficiencia de propagación de la semilla priónica de topillo rojo en niveles óptimos comparables a los obtenidos mediante PMCA [330]. Esta dependencia sobre la concentración de PrP está relacionada con el acortamiento de los tiempos de incubación observados en modelo animales murinos que sobreexpresan la PrP^C [434]. Durante el desarrollo de esta tesis doctoral, se ha observado que, tras el proceso de diálisis y preparación de sustrato, la concentración de rec-PrP humana obtenida era menor que la concentración alcanzada para otras rec-PrP (Figuras 10 y 11). Esto puede ser debido a que las rec-PrP humanas presentan ciertas particularidades que las predisponen a una mayor agregación inespecífica durante el proceso de diálisis para su plegamiento nativo. Por ello, el primer enfoque se centró en aumentar la concentración de rec-PrP humana post-diálisis partiendo de una concentración mayor de rec-PrP humana desnaturalizada. Inesperadamente, se comprobó que el incremento de proteína obtenido utilizando una mayor concentración de rec-PrP no fue proporcional a la concentración inicial. Esto puede ser debido a las características intrínsecas de las rec-PrP humanas que en un ambiente no regulado como por ejemplo en el entorno celular, la particular agregabilidad de las proteínas durante la diálisis depende exclusivamente de las características de su secuencia primaria y, por tanto, se trata de un evento difícil de modular. Al no haber alcanzado los niveles de concentración estándar, unido a que los resultados con esta rec-PrP indicaban que tampoco se conseguía un aumento proporcional de la concentración final y que parecía existir un límite máximo de concentración final en el sustrato (Figura 10; concentración 2x *versus* 4x de topillo rojo), se descartó

seguir trabajando en esta estrategia debido a la escasa relación coste-beneficio que supone. Además, los intentos de modificar las condiciones de diálisis mediante el uso de glicerol, Gdn-HCl o acetato sódico, que podrían contribuir a un proceso de plegamiento más progresivo y, por consiguiente, reducir la pérdida de proteína [390, 435], no resultaron en un incremento de concentración significativo y/o no aumentaron la eficiencia del malplegamiento espontáneo de las rec-PrP humanas, por lo que también se descartó seguir trabajando sobre las condiciones de diálisis.

Los esfuerzos se centraron, por tanto, en reducir o evitar la pérdida de rec-PrP humana durante su conservación o durante el proceso de PMSA. Por este motivo, se decidió no someter a procedimientos de congelación/descongelación a las rec-PrP humanas, evitando así una pérdida de proteína, aunque quizás no muy significativa, que pudiese añadir aún una mayor dificultad para su malplegamiento espontáneo. La formación de agregados en dichos procesos de congelación/descongelación también afectarían a la calidad del sustrato. Estos agregados inespecíficos de PrP podrían inducir la formación de más agregados amorfos limitando la aparición de priones *bona fide* mediante un evento de tipo siembra cruzada o *cross-seeding* [436], en un proceso auto-sustentado donde la presencia de estos agregados interferiría con el malplegamiento de la rec-PrP.

La utilización de partículas esféricas ha demostrado mejorar la propagación de priones, tanto en PMCA [437-439] como en PMSA [330]. En esta última, las partículas esféricas de zirconio-sílice, tanto de 0.5 mm como de 1.0 mm de diámetro, demostraron ser las más adecuadas para la propagación priónica. Sin embargo, en los estudios de generación espontánea con rec-PrP de otras especies llevados a cabo en nuestro laboratorio, las partículas esféricas de vidrio de 0.1 – 0.2 mm parecen ser más eficientes a la hora de promover la generación espontánea de rec-PrP^{res} (resultados pendientes de publicación). Esto se ha demostrado de forma empírica y aún se desconocen los mecanismos por los que las partículas esféricas de vidrio promueven la espontaneidad. Existen varias hipótesis con las que se trabaja: 1) la presencia de partículas esféricas de vidrio de 0.1 – 0.2 mm y la vibración de estas debido a la agitación, podrían provocar un incremento de la energía suministrada al sistema y, por tanto, favorecer la superación de la barrera energética necesaria para el malplegamiento espontáneo de rec-PrP a rec-PrP^{res}. Esto podría explicar posibles diferencias en relación al tamaño de las partículas esféricas, pero no explicaría las diferencias que se han observado al utilizar partículas esféricas del mismo tamaño, pero de distinta composición; 2) que estas partículas esféricas, al estar compuestas por vidrio, presentan una superficie cargada negativamente que favorecería la interacción electrostática, entre otras, con la rec-PrP, promoviendo el malplegamiento de la misma. Esta hipótesis estaría en consonancia con la idea de que existe una relación directa entre los polianiones y la eficiencia de propagación [440], actuando estos como anclajes o andamiajes moleculares que principian el malplegamiento de la PrP. Ejemplos de polianiones usados para la propagación de priones

serían las moléculas de RNA [441] y el dextrano sulfatado [258, 330] que, junto con sales, detergentes y rec-PrP favorecen la generación de priones recombinantes altamente infecciosas. También existen evidencias de la importancia de los polianiones en el proceso de propagación *in vivo*, como por ejemplo el caso de los glicanos como el heparán sulfato [442, 443]. Sin embargo, la utilización de partículas esféricas de vidrio de 0.1 – 0.2 mm no aumentó la eficiencia del malplegamiento espontáneo mediante PMSA de las rec-PrP humanas, tanto WT como mutadas, a diferencia de las rec-PrP de otras especies. Gracias a los experimentos para determinar el grado de adsorción de la rec-PrP en función de la superficie de partículas esféricas presente en el tubo de ensayo, se determinó que un exceso de partículas esféricas de vidrio podría ser la explicación de la ineficiencia de la PMSA para malplegar de forma espontánea la rec-PrP humana. La rec-PrP de topillo rojo no se vería tan limitada por este efecto de adsorción gracias de nuevo, a su alta propensión al malplegamiento espontáneo. Por ello, el cambio de partículas esféricas de vidrio de mayor tamaño que permitían alcanzar un equilibrio entre el número de partículas necesarias y una menor superficie de vidrio que no redujese drásticamente la concentración de rec-PrP plegada y soluble en el sustrato, permitió que por primera vez se consiguiera malplegar de forma espontánea la rec-PrP humana de ambos polimorfismos en una o dos rondas de PMSA.

Estos resultados nos acercaron a uno de los objetivos más importantes de esta tesis doctoral, que es la obtención de priones recombinantes *bona fide* para su utilización en la búsqueda de compuestos anti-priónicos específicos para las enfermedades priónicas humanas. Con el fin de continuar con la optimización de la PMSA adaptada a proteínas humanas, el siguiente estudio se centró en modificaciones sobre la velocidad de agitación. Este estudio evidenció que de forma general las velocidades de agitación más bajas (500 – 700 rpm) favorecían la generación espontánea de las rec-PrP^{res} humanas. Sin embargo, el efecto sobre la agitación repercutió en menor medida que los cambios aplicados sobre el tipo y cantidad de superficie de vidrio. Esto podría explicarse por la existencia de un rango de velocidades de agitación que favorecerían la interacción entre la rec-PrP y las fibras de rec-PrP^{res} nacientes. Suponiendo que el efecto de la agitación, unido a la presencia de partículas esféricas, tenga lugar a través de un incremento de la energía proporcionada por el sistema para superar la barrera energética necesaria para alcanzar la conformación de rec-PrP^{res}, se podrían elaborar varias hipótesis para explicar el efecto de la velocidad de agitación. En primer lugar, se asumiría que todas las velocidades de agitación dentro de un rango (500 – 1000 rpm) proporcionarían la energía suficiente al sistema para promover el malplegamiento espontáneo de las rec-PrP humanas, aunque cada una de ellas con una eficiencia determinada. Sin embargo, una vez generadas las primeras rec-PrP^{res}, estas actuarían como núcleo de polimerización facilitando el malplegamiento de las rec-PrP humanas del sistema. Así, para explicar una mayor eficiencia en la obtención de rec-PrP^{res} humana de las velocidades

de agitación menores, podemos hipotetizar con que una elevada velocidad de agitación podría dificultar la interacción entre las fibras de rec-PrP^{res} humanas nacientes y las moléculas de rec-PrP solubles del sustrato. Otra opción no excluyente de la anterior, es que una mayor velocidad de agitación también podría dificultar el posible efecto del dextrano sulfatado en el malplegamiento de la rec-PrP^{res} humana. Aun así, al no conocerse todavía los mecanismos que rigen el efecto de las partículas esféricas de vidrio y la velocidad de agitación sobre el malplegamiento espontáneo de la rec-PrP, no se puede determinar con seguridad la validez de esta u otras hipótesis.

Tras el proceso de optimización de la PMSA se determinaron los parámetros adecuados para el malplegamiento espontáneo de las rec-PrP humanas WT y con la mutación puntual I109: agitación continua a 700 rpm en presencia de partículas esféricas de vidrio de 1.0 mm y 39°C como temperatura de reacción. Además, el sustrato con el que se trabajó no sufrió procesos de congelación y descongelación para su conservación óptima. La aplicación de esta nueva metodología de forma sistemática mediante replicas permitió constatar que presenta una gran reproducibilidad y robustez, con la variabilidad propia de los procesos de malplegamiento *in vitro* [433]. Por tanto, esta nueva metodología permitiría obtener un panel de priones recombinantes humanos aplicable para la búsqueda de compuestos anti-priónicos para las diferentes EET humanas, más allá de las cuatro seleccionadas en este estudio en concreto. La utilización de rec-PrP humanas con diferentes mutaciones relacionadas con las distintas patologías priónicas permitiría, además de estudiar y caracterizar las posibles diferencias existentes entre cada una de estas variantes, desarrollar un método de cribado basado en diversas rec-PrP^{res} humanas, solventando en gran medida el problema de especificidad de cepa para la búsqueda de terapias anti-priónicas. Para alcanzar ese objetivo final, en primer lugar, fue necesario caracterizar las rec-PrP^{res} humanas obtenidas para determinar si presentaban las características para poder utilizarlas en el sistema de cribado. Este estudio se realizó con dos rec-PrP^{res} humanas M129 y dos rec-PrP^{res} humanas V129, que se seleccionaron basándose en que su patrón de movilidad electroforético era representativo de la variabilidad obtenida, descartando por ahora la selección de las rec-PrP^{res} humanas I109 debido a que, como se ha discutido a lo largo de esta sección, no se trata de una mutación natural de la PrP humana [293, 381]. Además de confirmar que las cuatro rec-PrP^{res} seleccionadas presentaban resistencia a la digestión por PK, los estudios para determinar la capacidad de propagación indefinida de las rec-PrP^{res} humanas por PMSA revelaron que la velocidad de agitación óptima para la propagación de semillas recombinantes de topillo rojo [330], no era la más adecuada para la propagación de las semillas recombinantes humanas. Esto podría ser debido, al igual que para el malplegamiento espontáneo de las rec-PrP humanas, a una mayor dificultad de las semillas recombinantes humanas para interactuar con la PrP del sustrato a velocidades de agitación mayores. Esta mayor comprensión y caracterización del sistema de PMSA

tanto para la generación espontánea de rec-PrP^{res} humanas como para la propagación de las mismas conseguida finalmente, permitiría explorar otras vías de obtención de nuevas rec-PrP^{res} humanas que en las condiciones iniciales no arrojaron resultados positivos, como por ejemplo la utilización de semillas de origen encefálico para inducir el malplegamiento de la PrP humana. No obstante, la necesidad de estudiar y optimizar la mayoría de los parámetros hasta tener que desarrollar una nueva metodología específica, pone de manifiesto la dificultad de trabajar con la PrP recombinante humana, en comparación con PrP de otras especies que presentan un rango más amplio sobre el que modificar ciertos parámetros, como la PrP de topillo rojo o de ratón.

Por otro lado, además de determinar la resistencia a PK y la capacidad de propagar de forma indefinida de las rec-PrP^{res} humanas, características necesarias de un prion *bona fide*, también se determinó que estas nuevas rec-PrP^{res} humanas eran bioquímicamente diferentes a otros tipos de agregados de rec-PrP obtenidos mediante otras metodologías. Se han desarrollado múltiples sistemas *in vitro* para lograr la obtención de diferentes materiales malplegados y agregados de la rec-PrP, cada uno de los cuales presenta características y condiciones determinadas, como variaciones de pH, el uso de agentes desnaturalizantes y/o caotrópicos, uso de agitación o sonicación, etc. [178, 330, 406, 444]. Las diferencias entre ellos, unido a la intrínseca capacidad de una misma proteína amiloidogénica de adoptar diferentes estructuras amiloides estables (polimorfos), son los responsables de la existencia de diferentes tipos de agregados compuestos de una misma PrP con distintas características biológicas y estructurales, base también de la existencia de las cepas priónicas [101, 445]. Además, es importante destacar que incluso la utilización de una misma metodología como la PMCA, puede propiciar la generación de entidades de PrP^{res} con propiedades biológicas diferentes, como la capacidad de infección [177, 331]. Por tanto, diferenciar las nuevas rec-PrP^{res} humanas generadas por PMSA de otros tipos de agregados de rec-PrP que no presentan las características de priones *bona fide* [96], sería un indicativo del alto potencial de estas proteínas malplegadas de constituirse en priones recombinantes *bona fide*, a falta de determinar su capacidad infecciosa *in vivo*. Por ello, las rec-PrP^{res} humanas se compararon con los agregados obtenidos en presencia de Gdn-HCl, que según estudios anteriores requirieron segundos pases en animales para inducir una enfermedad neurodegenerativa *in vivo* [96]. Además, el hecho de que durante la PMSA se puedan generar agregados que denominamos amorfos, con ninguna o alguna característica bioquímica asociada a los priones *bona fide* pero no transmisibles, nos llevó a aplicar condiciones de PMSA que no promueven la generación de rec-PrP^{res} pero que pueden inducir la agregación inespecífica de la rec-PrP en material amorfo. Además de presentar una amiloidogenicidad limitada de acuerdo con su respuesta a ThT y baja resistencia a PK, las fibras Gdn y el material amorfo no se propagaron por PMSA, por lo que aun considerando plausible que a pesar de sus características bioquímicas inusuales pudieran ser priones *bona fide*, la imposibilidad de

propagarlas en un sistema como la PMSA, nos lleva a concluir que se tratan de agregados de PrP claramente distinguibles de priones *bona fide* propiamente dichos, al contrario que las nuevas rec-PrP^{res} humanas seleccionadas para este estudio.

Sin embargo, para determinar fehacientemente si nos encontramos ante priones recombinantes *bona fide* es necesario evaluar la capacidad de infección de las rec-PrP^{res} en modelos animales. Los ensayos *in vivo* conllevan largos periodos de incubación, más aún en el caso de los modelos animales disponibles para las EET humanas, que pueden no llegar a desarrollar los signos de una enfermedad priónica durante su periodo de vida [426]. Por tanto, la evaluación previa de la potencial infectividad *in vivo* mediante una PMCA basada en homogeneizados de encéfalos del modelo animal en estudio [258, 330, 446], permite minimizar riesgos al poder diseñar la experimentación *in vivo* basándose en las predicciones realizadas *in vitro*. Por este motivo, las cuatro rec-PrP^{res} humanas se evaluaron en su capacidad de propagar utilizando una PMCA basada en homogeneizados de encéfalos de dos modelos animales diferentes. Debido a que la PMCA propaga con distinta eficiencia las distintas cepas priónicas humanas de origen encefálico, unido a que los sustratos basados en homogeneizados de encéfalos de la mayoría de modelos animales que expresan la PrP^C humana no suponen un sustrato eficiente para propagar algunos priones humanos por PMCA, la elección del modelo para estos estudios *in vitro* se vio limitada. Así, se seleccionó el modelo TgNN6h por diversas razones. En primer lugar, este modelo transgénico expresa la PrP^C humana sin glicosilaciones debido a las mutaciones puntuales de los sitios de anclaje de los glicanos (N181Q y N197Q), presentando por tanto una mayor similitud con la PrP recombinante humana. La caracterización de este modelo, además de indicar que expresa la PrP^C sin glicosilar unida a membrana, también ha determinado que las mutaciones puntuales N181Q y N197Q no afectan al plegamiento global de la PrP^C, como indican los espectros de CD obtenidos para la PrP^C sin glicosilar de estos animales y para la PrP recombinante humana WT [447]. Además, se ha demostrado que los sustratos basados en homogeneizados de encéfalos de estos animales transgénicos permiten la propagación de cepas esporádicas humanas sCJD MM1 y sCJD MM2 mediante PMCA [396]. En segundo lugar, se ha demostrado recientemente la susceptibilidad de este modelo animal a la infección por un prion recombinante humano obtenido mediante QuIC (Ensayo de conversión por agitación, del inglés, *Quaking induced Conversion*). Los animales desarrollaron signos neurológicos aproximadamente a los 500 días post-inoculación (dpi) en el primer pase y a los 230 dpi en el segundo pase en el mismo modelo [447]. Además, este estudio también demostró la capacidad de inducir una enfermedad priónica en el modelo TgNN6h de la cepa sCJD MM1, la cual fue usada como semilla para generar el prion recombinante humano en QuIC. Por todo ello, unido a las limitaciones de otros modelos animales existentes para el estudio de priones humanos, se decidió seleccionar el modelo TgNN6h para testar la capacidad de infección tanto *in vitro* como *in vivo*. El

hecho de que únicamente las rec-PrP^{res} humanas M129 fueran capaces de inducir el malplegamiento de la PrP^C del homogeneizado de encéfalos de estos animales puede deberse a la barrera polimórfica existente debida a la V129 de las rec-PrP^{res} y la M129 de la PrP^C del modelo. A este hecho hay que sumarle que este animal transgénico presenta una expresión reducida (0.6x) de la PrP^C en su SNC, lo que podría dificultar aún más la capacidad de propagación de las rec-PrP^{res} V129. Por todo ello, más que descartar la infectividad de las semillas recombinantes V129, estos datos sugieren que el modelo TgNN6h no es el más adecuado para evaluar su capacidad de infección *in vivo*. Por otro lado, las diferentes eficiencias a la hora de malplegar la PrP^C humana sin glicosilar mostradas por las rec-PrP^{res} M-E1 y M-E4 podría deberse a la estocasticidad del fenómeno de malplegamiento por PMCA o a diferencias en las características biológicas entre ambas, que podrían estar indicando la existencia de dos cepas. Además, la propagación por PMCA de ambas proteínas malplegadas dio lugar a productos con diferentes patrones electroforéticos, pudiendo también ser un indicio de diferencias biológicas entre ellas. No obstante, se necesita una caracterización más profunda de las propiedades biológicas de las semillas M-E1 y M-E4 en este modelo para confirmar tales evidencias. Para determinar si efectivamente se tratan de rec-PrP^{res} con propiedades biológicas diferentes con capacidad de generar una enfermedad priónica *in vivo*, se llevó a cabo la inoculación intracerebral en animales TgNN6h con las proteínas obtenidas directamente por PMSA y de los productos adaptados a la PrP^C del modelo TgNN6h obtenidos por PMCA. En estos momentos se está a la espera de observar los primeros signos clínicos asociados a neurodegeneración. Los periodos de incubación obtenidos por Kim y colaboradores al inocular el prion recombinante humano obtenido en QuIC [447] hacen que estimemos largos periodos de incubación hasta observar los primeros signos clínicos, motivo por el cual se decidió inocular los productos de PMCA adaptados a la PrP^C de TgNN6h, dado que podría provocar un acortamiento de los tiempos necesarios sin implicar un cambio en las propiedades de cada rec-PrP^{res} [102].

El otro modelo animal seleccionado para evaluar la capacidad de infección tanto *in vitro* como *in vivo* de las rec-PrP^{res} humanas obtenidas durante esta tesis doctoral fue el modelo transgénico TgVole. Este modelo expresa la PrP^C de topillo rojo con el polimorfismo I109, una proteína que ha demostrado propagar prácticamente la totalidad de los priones que se manejan habitualmente [410, 411]. Es por ello por lo que este modelo ha sido ampliamente utilizado tanto *in vivo* como *in vitro* mediante PMCA no solo para el estudio de priones humanos asociados a diferentes EET humanas [408, 448-450], sino también para el estudio de enfermedades priónicas de diferentes especies [451-453]. Se trata de un modelo de gran utilidad para estudiar la capacidad de infección de priones recombinantes humanos y determinar si presentan características biológicas similares a aquellos priones *bona fide* que han sido previamente estudiados en este modelo. La propagación *in vitro* de estas proteínas malplegadas por

PMCA utilizando homogeneizados de encéfalos de TgVole mostró de nuevo una mayor eficiencia de las rec-PrP^{res} M129 en comparación con las rec-PrP^{res} V129. Esto, al igual que las diferencias obtenidas con el modelo TgNN6h, podría ser indicativo de la existencia de diferencias biológicas entre las dos variantes polimórficas de rec-PrP^{res} humanas o deberse también a una barrera de especie más restrictiva. Al igual que con las cepas priónicas humanas *bona fide* responsables de las diferentes EET humanas, donde el genotipo y el patrón de movilidad electroforético de cada una de ellas se correlacionan con las características clínico-patológicas y bioquímicas de cada cepa [247], la existencia de una metionina o valina en el aminoácido 129 de estas proteínas podría otorgar características biológicas particulares a cada variante. Entre ellas, la capacidad o no de infectar un determinado modelo animal o la menor o mayor eficiencia de infección en dicho modelo. Por tanto, los ensayos *in vivo* en ambos modelos transgénicos son necesarios para determinar fehacientemente si son priones *bona fide* y si existen diferencias biológicas entre las rec-PrP^{res} humanas en estudio y, junto con una mayor caracterización *in vitro* de ellas, establecer si el aminoácido de la posición 129 es la causa de dichas diferencias.

La capacidad de causar una enfermedad priónica *in vivo* supondría un gran valor añadido para la búsqueda de compuestos anti-priónicos mediante el método desarrollado, dado que estas semillas recombinantes mimetizarían con gran fidelidad las características biológicas de los priones *bona fide* responsables de las enfermedades priónicas humanas, pudiendo ayudar a solventar el problema de la especificidad de especie y cepa. La adaptación de la técnica de PMSA para la obtención de priones recombinantes humanos espontáneos abre la posibilidad de obtener un panel de priones recombinantes humanos mediante la utilización de rec-PrP humanas con diferentes características. En este grupo entrarían proteínas con mutaciones puntuales asociadas a la patología o isoformas truncadas de la misma, las cuales pueden presentar propiedades bioquímicas y biológicas diferentes y ser reflejo de la variedad de cepas priónicas humanas *bona fide* existentes. El cribado de grandes bibliotecas de compuestos con potencial actividad anti-priónica basado en un panel de priones recombinantes humanos en lugar de en uno solo, reduciría significativamente el problema de la especificidad de cepa, permitiendo además avanzar en el conocimiento de las terapias combinadas para el tratamiento de las EET humanas. Por ello, las rec-PrP^{res} humanas se adaptaron al procedimiento de cribado masivo desarrollado para priones recombinantes de topillo rojo [332]. Al ser el objetivo de esta tesis doctoral la implementación de un sistema apto para el cribado masivo de compuestos específicos para humanos y no el cribado de una biblioteca de compuestos como tal, se decidió llevar a cabo la adaptación y prueba de concepto con una de las rec-PrP^{res} humanas que cumplía las características más importantes para implementar un sistema de cribado de compuestos: una alta resistencia a PK con un patrón bioquímico fácilmente distinguible y una alta capacidad de propagación

tras su dilución seriada (al menos 1:10⁷). Sin embargo, dado que conceptualmente el proceso de propagación en este formato es similar al formato en el que se han caracterizado todas las rec-PrP^{res} humanas y que no existen grandes diferencias entre las rec-PrP^{res} humanas generadas, cabe esperar que todas ellas, además de las futuras rec-PrP^{res} que se obtengan mediante esta metodología, puedan ser adaptadas con facilidad y sin grandes variaciones en los parámetros del sistema. La evaluación de la capacidad de inhibición de un compuesto tetrapirrólico del cual sabemos que es capaz de inhibir eficazmente la propagación de priones en diferentes especies (resultados pendientes de publicación) [294], mostró que el sistema desarrollado era capaz de detectar compuestos con un elevado potencial inhibitorio. Además, este sistema también se utilizó para evaluar la inhibición ejercida por los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85, previamente detectados mediante un sistema basado en PrP recombinante de topillo rojo. La alta capacidad de inhibición mostrada por el compuesto L2.JM56 en este sistema (1x10⁵ con respecto al control DMSO) concuerda con los datos de inhibición obtenidos por PMCA y PrP recombinante humana, donde también mostró una elevada capacidad de inhibición (1x10³ con respecto al control DMSO). Por otro lado, un dato sorprendente fue la capacidad de inhibición mostrada por el compuesto L2.JM85 a 100 µM, dado que todos los datos previos indicaban una alta especificidad de especie, inhibiendo únicamente a los priones de oveja a concentraciones mayores de 100 µM. Es la primera vez que se observa que este compuesto inhibe la propagación de una rec-PrP^{res} humana. Dado que esta inhibición tuvo lugar sobre un sustrato basado en PrP recombinante humana, dextrano sulfatado, sales y detergente, no se descarta que la inhibición mostrada con la semilla V-E0 se vea afectada si se lleva a cabo en presencia de homogeneizado de encéfalo. Para estudiar cómo la inhibición de la propagación de la semilla V-E0 se ve afectada en presencia de cofactores del encéfalo, será necesario previamente poner a punto el sistema de PMCA para permitir una propagación eficiente de esta semilla, lo cual basándonos en la experiencia obtenida durante esta tesis doctoral y a las diferentes capacidades que presentan distintas cepas humanas para propagar en PMCA [312, 429], puede no ser un proceso trivial. Por último, el compuesto L2.JM33 no mostró inhibición de la propagación priónica en este nuevo sistema, lo que podría ser debido a la menor concentración utilizada en comparación con los estudios previos, sin descartar problemas de especificidad de cepa.

Tras determinar que ciertos compuestos inhibidores de la propagación priónica en otras especies también eran capaces de ejercer su efecto anti-priónico en este nuevo sistema de cribado basado en la rec-PrP^{res} V-E0, se puso a prueba el sistema testando 18 compuestos tetrapirrólicos con gran similitud estructural con otros tetrapirroles conocidos, como el TMPyP-FeIII o el Tetrapirrol control. Estas moléculas se seleccionaron también por ser inhibidores de la propagación priónica de un prion recombinante de topillo rojo en un sistema similar. De esta forma, además de confirmar la capacidad

anti-priónica de estos tetrapirroles utilizando proteína humana, se buscaba identificar aquellos con distintos comportamientos en cuanto a la especificidad de especie y/o cepa. Cabe destacar que al tratarse de un número reducido de compuestos y al ser las primeras pruebas del sistema, la confirmación de los resultados derivados de la medición con ThT se llevó a cabo mediante *Western Blot*, determinando que ambos métodos presentan una sensibilidad similar. Esto se realizó debido al fenómeno de desactivación fluorescente o *quenching* que puede tener lugar en la medición con ThT. Y a pesar de ello se cree que el cribado de miles de compuestos se debería realizar utilizando este procedimiento frente a la utilización de técnicas de *immunoblot* que presentan una mayor dificultad técnica y un importante consumo de tiempo. El uso de ThT, a pesar de aumentar los posibles falsos positivos, permite un cribado rápido y sencillo, siendo únicamente necesario confirmar un número reducido de compuestos por *Western Blot*. Un ejemplo del buen funcionamiento de este procedimiento es el cribado masivo llevado a cabo en nuestro laboratorio, donde de 2500 compuestos de partida solo fue necesario realizar *Western Blot* a 42 de ellos que habían inhibido la propagación priónica [332]. La prueba de concepto mostró que la gran mayoría de los tetrapirroles inhibían la propagación priónica, un dato que era de esperar debido a la similitud existente con otros compuestos con conocida actividad anti-priónica. Sin embargo, uno de ellos no mostró capacidad de inhibición, posiblemente debido a la especificidad de especie y/o cepa. Por tanto, el cribado de grandes bibliotecas de compuestos mediante esta nueva metodología específica para EET humanas, nos permitirá detectar aquellos con alto potencial para inhibir la propagación de un prion recombinante humano, descartando los problemas derivados de la especie de la PrP en estudio. El disponer de un gran número de moléculas inhibitoras con elevada semejanza estructural, pero con diferencias en los grupos funcionales que presentan, nos permitirá llevar a cabo estudios de solubilidad, biodisponibilidad, farmacocinética y farmacodinámica para seleccionar aquellos que se convertirán en un futuro tratamiento de las enfermedades priónicas humanas.

A pesar de que aún no existe un tratamiento efectivo contra las EET humanas y de que muchos de los compuestos anti-priónicos hallados *in vitro* no han mostrado resultados positivos al ser testados mediante sistemas alternativos como los modelos *in cellula*, o en modelos *in vivo* o incluso en humanos mediante ensayos clínicos, las estrategias basadas en la búsqueda de pequeñas moléculas capaces de inhibir la propagación priónica constituyen una de las aproximaciones experimentales más exploradas en el campo de la enfermedades priónicas [60, 294, 386, 424, 454, 455]. La falta de conocimiento de los mecanismos de propagación, neurotoxicidad y dispersión de los priones por el organismo, así como el desconocimiento de la estructura tridimensional de la entidad infecciosa, dificultan en gran medida el diseño racional de nuevas estrategias terapéuticas. Esto aplica a todo tipo de aproximaciones encaminadas a prevenir o disminuir la neurodegeneración asociada a las EET humanas o a bloquear la

neuroinvasión de los priones mediante el uso de anticuerpos, compuestos neuroprotectores o mediante otras estrategias basadas en terapia génica como la reducción de los niveles de expresión de PrP^C en el SNC. El uso de anticuerpos contra las EET humanas ha sido y es objeto de estudio, encontrándose uno de ellos, denominado PRN100, actualmente en evaluación a través de un estudio basado en medicina experimental [348]. Lamentablemente, hasta la fecha no se han obtenido resultados positivos en dicho estudio y ningún otro anticuerpo diseñado para las EET humanas ha alcanzado la práctica clínica. Además, esta estrategia presenta algunas limitaciones importantes, como el posible efecto neurotóxico de determinados anticuerpos dirigidos contra regiones específicas de la PrP [350, 351] o la dificultad de atravesar la barrera hematoencefálica. Por otro lado, recientemente se han publicado los avances obtenidos en el estudio de la terapia con oligonucleótidos antisentido en la que trabajan Minikel y colaboradores [354, 355]. A pesar de ser una estrategia prometedora aún se encuentra en fase de desarrollo, habiéndose probado en modelos animales pero a la espera de ser testados en humanos mediante un ensayo clínico. Además, existen ciertas incógnitas relacionadas con este tipo de terapias encaminadas a reducir la expresión de la PrP^C, ya que esta se trata de una proteína ubicua y conservada a lo largo de la evolución, por lo que, aunque aún desconozcamos con certeza las funciones fisiológicas que desempeña, los posibles efectos fisiológicos adversos debido a la reducción o eliminación de esta proteína en humanos son desconocidos, aun habiéndose confirmado que parecen ser mínimas en determinados modelos animales [208, 456, 457]. Por todo ello, la búsqueda de compuestos capaces de inhibir la propagación priónica constituye una de las estrategias más populares, dado que no requiere conocer los aspectos neurobiológicos de los priones o su estructura tridimensional para determinar el potencial anti-priónico de las moléculas en estudio. Se basan en predecir las propiedades anti-priónicas de compuestos generalmente de pequeño tamaño basándose en la capacidad de unirse directamente a la PrP^C y/o PrP^{Sc} o de interferir en la interacción PrP^C– PrP^{Sc} [379]. La capacidad de las técnicas *in vitro* de propagación de priones de mimetizar en un tubo de ensayo el evento de malplegamiento que tiene lugar en el SNC permite evaluar el potencial inhibitorio de un compuesto determinado, a pesar de desconocer el mecanismo exacto por el cual ejerce dicha inhibición. El desarrollo de sistemas *in vitro* para el cribado masivo de grandes bibliotecas de moléculas, como el desarrollado durante esta tesis doctoral, permitirá detectar una gran cantidad de moléculas, con alta variabilidad funcional y estructural, y su posterior estudio en modelos más cercanos a la fisiología humana, como los sistemas *in cellula* e *in vivo*, revelarán los posibles mecanismos por los que actúan. Teniendo en cuenta que la terapia combinada puede ser de gran utilidad para el tratamiento de estas patologías, no solo por el uso de múltiples compuestos que eviten el malplegamiento de la PrP^C, sino también por el uso combinado con estrategias terapéuticas con diferentes enfoques, encontrar un mayor número de moléculas anti-priónicas gracias a los sistemas *in vitro* aumentará las posibilidades de desarrollar una terapia efectiva contra las EET humanas.

Durante las dos últimas décadas, se han desarrollado diferentes estrategias de cribado masivo basadas en una gran variedad de metodologías. Los primeros sistemas *in vitro* que se utilizaron para la búsqueda de compuestos se basaron en modelos celulares de infección priónica [295, 458] o en priones de levaduras [459], radicalmente diferentes a los priones de mamífero. Además del desarrollo de estos diferentes sistemas *in vitro*, se han aplicado diversas técnicas biofísicas a la búsqueda de compuestos anti-priónicos, como por ejemplo la resonancia de plasmones superficiales (SPR, del inglés, *Surface Plasmon Resonance*) [460], la espectroscopía de correlación de fluorescencia [461, 462] o sistemas computacionales *in silico* [463]. Sin embargo, estos sistemas se basan en la unión o interacción de la molécula en estudio con la PrP en su conformación nativa, pero no permiten estudiar de forma directa la disminución o inhibición de la propagación priónica, dado que solo pueden detectar interacciones entre los compuestos y la PrP. Por tanto, si la unión de la molécula a la PrP no evita el proceso de malplegamiento dado que no consigue estabilizar su forma nativa o no consigue interferir en su interacción con la PrP^{Sc} a pesar de unirse a la PrP, no mostrará propiedades anti-priónicas en los distintos modelos utilizados, aumentando por tanto el número de compuestos que en la práctica deben considerarse falsos positivos. Tras detectar aquellos compuestos que interaccionan con la PrP es necesario un flujo de trabajo basado en sistemas *in vitro* de propagación de priones, modelos celulares y modelos *in vivo* para determinar fehacientemente la capacidad anti-priónica de estos compuestos [464]. Sin embargo, la utilización de sistemas de propagación de priones como la PMCA y la PMSA, los cuales pueden ser de elección para validar aquellos compuestos detectados mediante técnicas biofísicas e *in silico*, permiten medir directamente el efecto del compuesto sobre el malplegamiento priónico. Esta característica permite detectar aquellos que interaccionen con la PrP^{Sc} y no solo con la PrP^C o rec-PrP, como los métodos previamente mencionados. Dentro de los sistemas *in vitro* de propagación priónica existen también diferentes métodos, siendo los principales la PMCA y la RT-QuIC, que también han sido utilizados para la búsqueda de compuestos con actividad anti-priónica [316, 326]. Sin embargo, aunque la RT-QuIC ha demostrado gran utilidad para la búsqueda de compuestos inhibidores, dada su escalabilidad y posibilidad de automatización, el dar lugar a productos no infecciosos *in vivo* [325] supone una importante limitación, dado que algunos inhibidores de la formación de este tipo de agregados amiloides podrían no ser efectivos frente a los priones *bona fide*. Por el contrario, la PMCA, que sí propaga priones infecciosos, presenta limitaciones técnicas para el cribado masivo, siendo más difícil de automatizar y requiriendo equipos de elevado coste. Por tanto, el desarrollo de la PMSA, un sistema fácilmente escalable, capaz de propagar eficientemente priones recombinantes *bona fide* y su adaptación para la obtención de rec-PrP^{res} humanas, llevada a cabo durante esta tesis doctoral, permitirá aunar las principales características que debe poseer un sistema *in vitro* de cribado masivo: estar basado en priones *bona fide*, permitir procesar miles de muestras en un corto periodo de tiempo y ser específico para la especie en estudio.

Finalmente, durante esta tesis doctoral se quiso explorar una nueva metodología de propagación priónica *in vitro*, la cual se basa en la capacidad de adsorción a diferentes materiales y superficies que presentan los priones y que ya ha sido previamente explorada y utilizada por otros investigadores y en nuestro laboratorio con priones recombinantes de otras especies (resultados pendientes de publicación). Se ha demostrado que los priones se adsorben con gran avidéz a superficies metálicas, manteniendo su capacidad de infección *in vivo* [465, 466] e *in cellula* [467]. A partir de estos descubrimientos, se ha utilizado esta capacidad de los priones de unirse a superficies metálicas para mejorar la detección de priones en cantidades mínimas de muestra mediante PMCA [414], RT-QuIC [415] y modelos celulares [413], así como para evaluar nuevos métodos de descontaminación priónica [468-470]. Los estudios de descontaminación de priones adsorbidos a superficies metálicas son de gran importancia dado que se han reportado casos de iCJD debido a la reutilización de material quirúrgico contaminado [471]. Por tanto, esta nueva metodología de propagación priónica basada en la utilización de partículas esféricas con rec-PrP^{res} de diferentes especies adsorbidas a su superficie como semilla, entre ellos rec-PrP^{res} humana, ofrece una forma fácil y eficaz de evaluar la capacidad de descontaminación de una gran variedad de productos (resultados pendientes de publicación). Este mismo principio se aplica en esta tesis a la detección de compuestos con actividad anti-priónica, ofreciendo algunas ventajas respecto al ensayo basado en diluciones seriadas.

La demostración de que las rec-PrP^{res} humanas obtenidas espontáneamente se adsorben eficientemente a las partículas esféricas de zirconio – sílice manteniendo todas sus características, ha permitido el desarrollo de un sistema alternativo de cribado masivo. La gran versatilidad de esta metodología, así como el fácil manejo de las muestras priónicas en formato de partículas esféricas adsorbidas unido a la sencillez de los sustratos necesarios para la PMSA y los equipos básicos utilizados, hace que esta nueva metodología de PMSA pueda implementarse fácilmente en otros laboratorios con medidas básicas de seguridad para el trabajo con agentes patógenos. La escalabilidad de la PMSA hace que la producción de grandes cantidades de partículas adsorbidas con rec-PrP^{res} sea fácil y rápida, requiriendo una única ronda de PMSA para su obtención. Esto permite la generación de grandes lotes de partículas esféricas adsorbidas para su distribución en un formato “listo para usar”, lo que implica una mínima manipulación de la muestra priónica del investigador que las adquiera y una alta reproducibilidad de los resultados en cualquier laboratorio. Todo esto, unido a la sencillez del método de visualización de los resultados, basado en espectroscopía de fluorescencia gracias a la ThT, para la cual no es necesaria la digestión de la muestra con proteinasa y tampoco la utilización de técnicas de *immunoblot* que implican una mayor manipulación de la muestra y una mayor dificultad técnica, hace que el cribado masivo de bibliotecas de compuestos con potencial anti-priónico se pueda distribuir e implementar de una forma sencilla en muchos laboratorios. Esto tiene una gran relevancia, dado que

supondría la democratización de una técnica de propagación de priones *in vitro* apta para la búsqueda de terapias contra las EET humanas, ayudando a potenciar sin la necesidad de técnicas de gran complejidad, no solo la búsqueda de compuestos anti-priónicos, sino otros campos de investigación dentro de las enfermedades priónicas, como los estudios de descontaminación, barrera de transmisión, etc. Además, frente al sistema *in vitro* de cribado de compuestos mediante diluciones seriadas de la semilla, esta metodología basada en partículas esféricas con rec-Pr^{P^{res}} adsorbidas, ofrece una elevada sensibilidad, como demuestra el hecho de haber detectado actividad anti-priónica a concentraciones menores de los compuestos. Este incremento de sensibilidad podría conllevar un aumento de la capacidad de este sistema para detectar compuestos con menor potencial inhibitorio, como el Tetrapirrol 13. La sensibilidad y capacidad del sistema para detectar compuestos con diferentes potenciales inhibitorios son parámetros fácilmente ajustables mediante la realización de ensayos a distintos tiempos y menores concentraciones. La utilización de rondas de PMSA de menor duración ha permitido detectar diferencias entre el Tetrapirrol control y el Tetrapirrol 8 a concentraciones bajas de ambos, mostrando que estos compuestos presentan eficacias anti-priónicas diferentes. La reducción de la concentración del Tetrapirrol 13 ha permitido confirmar que no inhibe la propagación priónica a determinadas concentraciones, como demuestra su comportamiento a 50 y 10 μ M. Los posibles falsos positivos de compuestos no inhibidores mediante este sistema podría deberse a que las partículas esféricas utilizadas como semilla equivalen a diluciones mayores de las semillas en formato líquido, encontrándonos en el límite del sistema para detectar inhibidores a concentraciones altas. Por tanto, queda demostrado que este problema se solventa con una reducción de la concentración de los compuestos, lo que a su vez supone una ventaja debido al menor gasto de material que conlleva. Esta nueva metodología presenta, por tanto, además de gran reproducibilidad, una gran versatilidad.

CONCLUSIONES

- 1) Tras la modificación de los parámetros clave se ha optimizado la metodología de propagación de priones *in vitro* para adaptarla al uso específico de PrP recombinante humana.
- 2) La optimización de esta metodología de propagación *in vitro* ha permitido obtener por primera vez PrP recombinantes humanas malplegadas de forma espontánea por PMSA.
- 3) La caracterización bioquímica de estas proteínas ha demostrado que presentan las propiedades esperadas para un prion *bona fide*. Los resultados sugieren que podrían tratarse de diferentes confórmeros.
- 4) La adaptación de una de las PrP recombinantes humanas malplegadas al sistema de cribado masivo ha mostrado una buena capacidad para detectar compuestos anti-priónicos previamente identificados mediante el ensayo basado en proteína recombinante de topillo rojo.
- 5) Una prueba de concepto realizada con el nuevo sistema utilizando un panel de compuestos tetrapirrólicos ha demostrado su validez para la detección de compuestos específicos frente a las EET humanas.
- 6) El cribado específico de compuestos frente a las EET humanas ha revelado que seis de los dieciocho tetrapirroles estudiados presentan una menor o nula actividad anti-priónica en comparación con la mostrada en el sistema basado en priones recombinantes de topillo rojo.
- 7) La propiedad de las PrP recombinantes humanas malplegadas de adsorberse a la superficie de partículas de zirconio – sílice ha permitido desarrollar una metodología alternativa de propagación de priones *in vitro* adaptable al cribado masivo de compuestos anti-priónicos.
- 8) La evaluación de la metodología alternativa utilizando algunos de los compuestos tetrapirrólicos anteriores ha demostrado que presenta una sensibilidad y especificidad similar al sistema de cribado masivo basado en diluciones seriadas para la detección de compuestos anti-priónicos.
- 9) La metodología desarrollada para la obtención de PrP recombinantes malplegadas humanas junto con el diseño de nuevos sistemas para el cribado masivo es una herramienta de gran utilidad para la detección de compuestos específicos que potencialmente se convertirán en una terapia frente a las EET humanas.

REFERENCIAS

1. **Will RG, Ironside JW.** Sporadic and Infectious Human Prion Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **2017**;7(1). doi: 10.1101/cshperspect.a024364.
2. **Schmitz M, Dittmar K, Llorens F, Gelpi E, Ferrer I, Schulz-Schaeffer WJ, et al.** Hereditary Human Prion Diseases: an Update. *Mol Neurobiol.* **2016.** doi: 10.1007/s12035-016-9918-y.
3. **Ironside JW, Ritchie DL, Head MW.** Prion diseases. *Handb Clin Neurol.* **2017**;145:393-403. doi: 10.1016/B978-0-12-802395-2.00028-6.
4. **Imran M, Mahmood S.** An overview of animal prion diseases. *Virology.* **2011**;8:493. doi: 10.1186/1743-422X-8-493.
5. **Windl O, Dawson M.** Animal prion diseases. *Subcell Biochem.* **2012**;65:497-516. doi: 10.1007/978-94-007-5416-4_18.
6. **Budka H, Aguzzi A, Brown P, Brucher JM, Bugiani O, Gullotta F, et al.** Neuropathological diagnostic criteria for Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and other human spongiform encephalopathies (prion diseases). *Brain Pathol.* **1995**;5(4):459-66.
7. **Aguzzi A, Calella AM.** Prions: protein aggregation and infectious diseases. *Physiol Rev.* **2009**;89(4):1105-52. doi: 10.1152/physrev.00006.2009.
8. **Erana H.** The Prion 2018 round tables (II): Aβeta, tau, alpha-synuclein... are they prions, prion-like proteins, or what? *Prion.* **2019**;13(1):41-5. doi: 10.1080/19336896.2019.1569451.
9. **Meyer-Luehmann M, Coomaraswamy J, Bolmont T, Kaeser S, Schaefer C, Kilger E, et al.** Exogenous induction of cerebral beta-amyloidogenesis is governed by agent and host. *Science.* **2006**;313(5794):1781-4. doi: 10.1126/science.1131864.
10. **Watts JC, Giles K, Oehler A, Middleton L, Dexter DT, Gentleman SM, et al.** Transmission of multiple system atrophy prions to transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2013**;110(48):19555-60. doi: 10.1073/pnas.1318268110.
11. **Lohmann S, Bernis ME, Tachu BJ, Ziemski A, Grigoletto J, Tamguney G.** Oral and intravenous transmission of alpha-synuclein fibrils to mice. *Acta Neuropathol.* **2019**;138(4):515-33. doi: 10.1007/s00401-019-02037-5.
12. **Liberski PP.** Historical overview of prion diseases: a view from afar. *Folia Neuropathol.* **2012**;50(1):1-12.
13. **Griffith JS.** Self-replication and scrapie. *Nature.* **1967**;215(5105):1043-4.
14. **Cuille J, Chelle P.** La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable? *CR Acad Sci.* **1936**;203:1552-4.
15. **Gordon WS.** Advances in veterinary research. *Vet Rec.* **1946**;58(47):516-25.
16. **Creutzfeldt H.** Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z Gesamte Neurol Psychiatr.* **1920**;57:1-19.
17. **Jakob A.** Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischem Befunde. (Spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Z Gesamte Neurol Psychiatr.* **1921**;64:147-228.
18. **Spielmeyer W.** Die Histopathologische Forschung in der Psychiatrie. *Klinische Wochenschrift.* **1922**;1:1817-9.
19. **Katscher F.** It's Jakob's Disease, Not Creutzfeldt's. *Nature.* **1998**;393(6680):1. doi: 10.1038/29862.
20. **Zabel MD, Reid C.** A brief history of prions. *Pathog Dis.* **2015**;73(9):ftv087. doi: 10.1093/femspd/ftv087.
21. **Liberski PP, Sikorska B, Brown P.** Kuru: the first prion disease. *Adv Exp Med Biol.* **2012**;724:143-53. doi: 10.1007/978-1-4614-0653-2_12.
22. **Klatzo I, Gajdusek DC, Zigas V.** Pathology of Kuru. *Lab Invest.* **1959**;8(4):799-847.
23. **Hadlow WJ.** Scrapie and Kuru. *Lancet.* **1959**;2:289-90.
24. **Hadlow WJ.** Kuru likened to scrapie: the story remembered. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **2008**;363(1510):3644. doi: 10.1098/rstb.2008.4013.

25. **Gajdusek C, Gibbs C, Alpers M.** Experimental transmission of kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature*. **1966**;209:794-6.
26. **Beck E, Daniel PM, Alpers M, Gajdusek DC, Gibbs CJ, Jr.** Neuropathological comparisons of experimental kuru in chimpanzees with human kuru. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. **1969**;36:Suppl:553-62.
27. **Gibbs CJ, Jr., Gajdusek DC, Asher DM, Alpers MP, Beck E, Daniel PM, et al.** Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science*. **1968**;161(3839):388-9.
28. **Zeidman LA, Ziller MG, Shevell M.** Gerstmann, Straüssler, and Scheinker. The persecution of the men behind the syndrome. *Neurology*. **2014**;83(3):272-7. doi: 10.1212/WNL.0000000000000606.
29. **Boellaard JW, Schlote W.** [Subacute spongiform encephalopathy with multiform plaque formation. "Peculiar familial-hereditary disease of CNS [spinocerebellar atrophy with dementia, plaques, and plaque-like deposits in cerebellum and cerebrum" (Gerstmann, Straussler, Scheinker)] (author's transl)]. *Acta Neuropathol*. **1980**;49(3):205-12.
30. **Hsiao K, Baker HF, Crow TJ, Poulter M, Owen F, Terwilliger JD, et al.** Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. *Nature*. **1989**;338(6213):342-5. doi: 10.1038/338342a0.
31. **Lugaresi E, Medori R, Montagna P, Baruzzi A, Cortelli P, Lugaresi A, et al.** Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N Engl J Med*. **1986**;315(16):997-1003. doi: 10.1056/NEJM198610163151605.
32. **Cracco L, Appleby BS, Gambetti P.** Fatal familial insomnia and sporadic fatal insomnia. *Handb Clin Neurol*. **2018**;153:271-99. doi: 10.1016/B978-0-444-63945-5.00015-5.
33. **Gambetti P, Dong Z, Yuan J, Xiao X, Zheng M, Alshekhlee A, et al.** A novel human disease with abnormal prion protein sensitive to protease. *Ann Neurol*. **2008**;63(6):697-708. doi: 10.1002/ana.21420.
34. **Williams ES, Young S.** Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J Wildl Dis*. **1980**;16(1):89-98.
35. **Barlow RM.** Transmissible mink encephalopathy: pathogenesis and nature of the aetiological agent. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)*. **1972**;6:102-9.
36. **Aldhous P.** BSE: spongiform encephalopathy found in cat. *Nature*. **1990**;345(6272):194. doi: 10.1038/345194c0.
37. **Kirkwood JK, Wells GA, Wilesmith JW, Cunningham AA, Jackson SI.** Spongiform encephalopathy in an arabian oryx (*Oryx leucoryx*) and a greater kudu (*Tragelaphus strepsiceros*). *Vet Rec*. **1990**;127(17):418-20.
38. **Kirkwood JK, Cunningham AA, Austin AR, Wells GA, Sainsbury AW.** Spongiform encephalopathy in a greater kudu (*Tragelaphus strepsiceros*) introduced into an affected group. *Vet Rec*. **1994**;134(7):167-8.
39. **Wells GA, Scott AC, Johnson CT, Gunning RF, Hancock RD, Jeffrey M, et al.** A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec*. **1987**;121(18):419-20.
40. **Hill AF, Desbruslais M, Joiner S, Sidle KC, Gowland I, Collinge J, et al.** The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature*. **1997**;389(6650):448-50, 526. doi: 10.1038/38925.
41. **Duffy P, Wolf J, Collins G, DeVoe AG, Streeten B, Cowen D.** Letter: Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med*. **1974**;290(12):692-3.
42. **Johnson RT.** Slow infections of the nervous system and the subacute spongiform encephalopathies. *Adv Neurol*. **1974**;6:69-75.
43. **Gibbs CJ, Jr.** Search for infectious etiology in chronic and subacute degenerative diseases of the central nervous system. *Curr Top Microbiol Immunol*. **1967**;40:44-58.
44. **Lampert PW, Gajdusek DC, Gibbs CJ, Jr.** Subacute spongiform virus encephalopathies. Scrapie, Kuru and Creutzfeldt-Jakob disease: a review. *Am J Pathol*. **1972**;68(3):626-52.
45. **Pattison IH, Millson GC.** Further experimental observations on scrapie. *J Comp Pathol*. **1961**;71:350-9.
46. **Pattison IH.** Resistance of the Scrapie Agent to Formalin. *J Comp Pathol*. **1965**;75:159-64.

47. **Solfrosi L, Milani M, Mancini N, Clementi M, Burioni R.** A closer look at prion strains: characterization and important implications. *Prion*. **2013**;7(2):99-108. doi: 10.4161/pri.23490.
48. **Chandler RL.** Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet*. **1961**;1(7191):1378-9.
49. **Chandler RL, Fisher J.** Experimental Transmission of Scrapie to Rats. *Lancet*. **1963**;2(7318):1165.
50. **Morris JA, Gajdusek DC, Gibbs CJ, Jr.** Spread of scrapie from inoculated to uninoculated mice. *Proc Soc Exp Biol Med*. **1965**;120(1):108-10.
51. **Latarjet R, Muel B, Haig DA, Clarke MC, Alper T.** Inactivation of the scrapie agent by near monochromatic ultraviolet light. *Nature*. **1970**;227(5265):1341-3.
52. **Alper T, Haig DA, Clarke MC.** The scrapie agent: evidence against its dependence for replication on intrinsic nucleic acid. *J Gen Virol*. **1978**;41(3):503-16.
53. **Alper T, Haig DA, Clarke MC.** The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem Biophys Res Commun*. **1966**;22(3):278-84. doi: 0006-291X(66)90478-5 [pii].
54. **Prusiner SB, McKinley MP, Groth DF, Bowman KA, Mock NI, Cochran SP, et al.** Scrapie agent contains a hydrophobic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1981**;78(11):6675-9.
55. **Prusiner SB.** Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*. **1982**;216(4542):136-44.
56. **Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB.** Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science*. **1982**;218(4579):1309-11.
57. **Merz PA, Somerville RA, Wisniewski HM, Iqbal K.** Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta Neuropathol*. **1981**;54(1):63-74.
58. **Merz P, Somerville R, Wisniewski H, Manuelidis L, Manuelidis E.** Scrapie-associated fibrils in Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature*. **1983**;306(5942):474-6.
59. **Merz PA, Rohwer RG, Kascsak R, Wisniewski HM, Somerville RA, Gibbs CJ, Jr., et al.** Infection-specific particle from the unconventional slow virus diseases. *Science*. **1984**;225(4660):437-40.
60. **Prusiner SB, McKinley MP, Bowman KA, Bolton DC, Bendheim PE, Groth DF, et al.** Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell*. **1983**;35(2 Pt 1):349-58. doi: 0092-8674(83)90168-X.
61. **Prusiner SB, Groth DF, Bolton DC, Kent SB, Hood LE.** Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. *Cell*. **1984**;38(1):127-34. doi: 0092-8674(84)90533-6.
62. **Chesebro B, Race R, Wehrly K, Nishio J, Bloom M, Lechner D, et al.** Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature*. **1985**;315(6017):331-3.
63. **Oesch B, Westaway D, Walchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, et al.** A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*. **1985**;40(4):735-46. doi: 0092-8674(85)90333-2.
64. **Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Walchli M, Groth DF, et al.** Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell*. **1986**;46(3):417-28. doi: 0092-8674(86)90662-8.
65. **Borchelt DR, Scott M, Taraboulos A, Stahl N, Prusiner SB.** Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J Cell Biol*. **1990**;110(3):743-52.
66. **Caughey B, Raymond GJ.** The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J Biol Chem*. **1991**;266(27):18217-23.
67. **Stahl N, Baldwin MA, Teplow DB, Hood L, Gibson BW, Burlingame AL, et al.** Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry*. **1993**;32(8):1991-2002.
68. **Caughey BW, Dong A, Bhat KS, Ernst D, Hayes SF, Caughey WS.** Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry*. **1991**;30(31):7672-80.
69. **Gasset M, Baldwin MA, Fletterick RJ, Prusiner SB.** Perturbation of the secondary structure of the scrapie prion protein under conditions that alter infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1993**;90(1):1-5.

70. **Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, et al.** Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1993**;90(23):10962-6.
71. **Meyer RK, McKinley MP, Bowman KA, Braunfeld MB, Barry RA, Prusiner SB.** Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1986**;83(8):2310-4.
72. **Cohen FE, Prusiner SB.** Pathologic conformations of prion proteins. *Annu Rev Biochem.* **1998**;67:793-819. doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.793.
73. **Fraser H, Bruce M.** Argyrophilic plaques in mice inoculated with scrapie from particular sources. *Lancet.* **1973**;1(7803):617-8. doi: S0140-6736(73)90775-7.
74. **Kim MO, Takada LT, Wong K, Forner SA, Geschwind MD.** Genetic PrP Prion Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2018**;10(5). doi: 10.1101/cshperspect.a033134.
75. **Dickinson AG, Meikle VM, Fraser H.** Identification of a gene which controls the incubation period of some strains of scrapie agent in mice. *J Comp Pathol.* **1968**;78(3):293-9. doi: 0021-9975(68)90005-4.
76. **Pattison IH, Gordon WS, Millson GC.** Experimental production of scrapie in goats. *J Comp Pathol.* **1959**;69:300-12.
77. **Pattison IH, Millson GC.** Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome. *J Comp Pathol.* **1961**;71:101-9.
78. **Carlson GA, Kingsbury DT, Goodman PA, Coleman S, Marshall ST, DeArmond S, et al.** Linkage of prion protein and scrapie incubation time genes. *Cell.* **1986**;46(4):503-11. doi: 0092-8674(86)90875-5.
79. **Moore RC, Hope J, McBride PA, McConnell I, Selfridge J, Melton DW, et al.** Mice with gene targeted prion protein alterations show that Prnp, Sinc and Prni are congruent. *Nat Genet.* **1998**;18(2):118-25. doi: 10.1038/ng0298-118.
80. **Gajdusek DC, Gibbs CJ, Jr., Alpers M.** Transmission and passage of experimental "kuru" to chimpanzees. *Science.* **1967**;155(3759):212-4.
81. **Palmiter RD, Chen HY, Brinster RL.** Differential regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion genes in transgenic mice and their offspring. *Cell.* **1982**;29(2):701-10.
82. **Scott M, Foster D, Miranda C, Serban D, Coufal F, Walchli M, et al.** Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell.* **1989**;59(5):847-57. doi: 0092-8674(89)90608-9 [pii].
83. **Hsiao K, Scott M, Foster D, DeArmond SJ, Groth D, Serban H, et al.** Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with prion protein codon 101 proline----leucine substitution. *Ann N Y Acad Sci.* **1991**;640:166-70.
84. **Nazor KE, Kuhn F, Seward T, Green M, Zwald D, Purro M, et al.** Immunodetection of disease-associated mutant PrP, which accelerates disease in GSS transgenic mice. *EMBO J.* **2005**;24(13):2472-80. doi: 10.1038/sj.emboj.7600717.
85. **Büeler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, et al.** Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell.* **1993**;73:1339-47.
86. **Bueler H, Raeber A, Sailer A, Fischer M, Aguzzi A, Weissmann C.** High prion and PrPSc levels but delayed onset of disease in scrapie-inoculated mice heterozygous for a disrupted PrP gene. *Mol Med.* **1994**;1(1):19-30.
87. **Fischer M, Rulicke T, Raeber A, Sailer A, Moser M, Oesch B, et al.** Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J.* **1996**;15(6):1255-64.
88. **Brandner S, Jaunmuktane Z.** Prion disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathol.* **2017**;133(2):197-222. doi: 10.1007/s00401-017-1670-5.
89. **Torres JM, Castilla J, Pintado B, Gutierrez-Adan A, Andreatti O, Aguilar-Calvo P, et al.** Spontaneous generation of infectious prion disease in transgenic mice. *Emerg Infect Dis.* **2013**;19(12):1938-47. doi: 10.3201/eid1912.130106.

90. **Jackson WS, Borkowski AW, Watson NE, King OD, Faas H, Jasanoff A, et al.** Profoundly different prion diseases in knock-in mice carrying single PrP codon substitutions associated with human diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2013**;110(36):14759-64. doi: 10.1073/pnas.1312006110.
91. **Watts JC, Giles K, Stohr J, Oehler A, Bhardwaj S, Grillo SK, et al.** Spontaneous generation of rapidly transmissible prions in transgenic mice expressing wild-type bank vole prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2012**;109(9):3498-503. doi: 10.1073/pnas.1121556109.
92. **Kocisko DA, Come JH, Priola SA, Chesebro B, Raymond GJ, Lansbury PT, et al.** Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature.* **1994**;370(6489):471-4. doi: 10.1038/370471a0.
93. **Saborio GP, Permanne B, Soto C.** Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature.* **2001**;411(6839):810-3. doi: 10.1038/35081095.
94. **Castilla J, Saa P, Hetz C, Soto C.** In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell.* **2005**;121(2):195-206. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.011.
95. **Legname G, Baskakov IV, Nguyen HO, Riesner D, Cohen FE, DeArmond SJ, et al.** Synthetic mammalian prions. *Science.* **2004**;305(5684):673-6. doi: 10.1126/science.1100195.
96. **Makarava N, Kovacs GG, Bocharova O, Savtchenko R, Alexeeva I, Budka H, et al.** Recombinant prion protein induces a new transmissible prion disease in wild-type animals. *Acta Neuropathol.* **2010**;119(2):177-87. doi: 10.1007/s00401-009-0633-x.
97. **Kim JI, Cali I, Surewicz K, Kong Q, Raymond GJ, Atarashi R, et al.** Mammalian prions generated from bacterially expressed prion protein in the absence of any mammalian cofactors. *J Biol Chem.* **2010**;285(19):14083-7. doi: 10.1074/jbc.C110.113464.
98. **Wang F, Wang X, Yuan CG, Ma J.** Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein. *Science.* **2010**;327(5969):1132-5. doi: 10.1126/science.1183748.
99. **Soto C.** Prion hypothesis: the end of the controversy? *Trends Biochem Sci.* **2011**;36(3):151-8. doi: 10.1016/j.tibs.2010.11.001.
100. **Bessen RA, Kocisko DA, Raymond GJ, Nandan S, Lansbury PT, Caughey B.** Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein. *Nature.* **1995**;375(6533):698-700. doi: 10.1038/375698a0.
101. **Igel-Egalon A, Bohl J, Moudjou M, Herzog L, Reine F, Rezaei H, et al.** Heterogeneity and Architecture of Pathological Prion Protein Assemblies: Time to Revisit the Molecular Basis of the Prion Replication Process? *Viruses.* **2019**;11(5). doi: 10.3390/v11050429.
102. **Castilla J, Morales R, Saa P, Barria M, Gambetti P, Soto C.** Cell-free propagation of prion strains. *EMBO J.* **2008**;27(19):2557-66. doi: 10.1038/emboj.2008.181.
103. **Magnusson K, Simon R, Sjölander D, Sigurdson C, Hammarström P, Nilsson K.** Multimodal fluorescence microscopy of prion strain specific PrP deposits stained by thiophene-based amyloid ligands. *Prion.* **2014**;8(4):319-29. doi: 10.4161/pri.29239.
104. **Caughey B, Raymond GJ, Bessen RA.** Strain-dependent differences in beta-sheet conformations of abnormal prion protein. *J Biol Chem.* **1998**;273(48):32230-5.
105. **Mo H, Moore RC, Cohen FE, Westaway D, Prusiner SB, Wright PE, et al.** Two different neurodegenerative diseases caused by proteins with similar structures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2001**;98(5):2352-7. doi: 10.1073/pnas.051627998.
106. **Noble GP, Wang DW, Walsh DJ, Barone JR, Miller MB, Nishina KA, et al.** A Structural and Functional Comparison Between Infectious and Non-Infectious Autocatalytic Recombinant PrP Conformers. *PLoS Pathog.* **2015**;11(6):e1005017. doi: 10.1371/journal.ppat.1005017.
107. **Wickner RB, Shewmaker FP, Bateman DA, Edskes HK, Gorkovskiy A, Dayani Y, et al.** Yeast prions: structure, biology, and prion-handling systems. *Microbiol Mol Biol Rev.* **2015**;79(1):1-17. doi: 10.1128/MMBR.00041-14.
108. **Si K, Lindquist S, Kandel ER.** A neuronal isoform of the aplysia CPEB has prion-like properties. *Cell.* **2003**;115(7):879-91. doi: S0092867403010201.
109. **Hou F, Sun L, Zheng H, Skaug B, Jiang QX, Chen ZJ.** MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell.* **2011**;146(3):448-61. doi: 10.1016/j.cell.2011.06.041.

110. **Sanchez de Groot N, Torrent M, Villar-Pique A, Lang B, Ventura S, Gsponer J, et al.** Evolutionary selection for protein aggregation. *Biochem Soc Trans.* **2012**;40(5):1032-7. doi: 10.1042/BST20120160.
111. **Chiti F, Dobson CM.** Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annu Rev Biochem.* **2017**;86:27-68. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-045115.
112. **Colby DW, Prusiner SB.** Prions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2011**;3(1):a006833. doi: 10.1101/cshperspect.a006833.
113. **Calzolari L, Lysek DA, Perez DR, Guntert P, Wuthrich K.** Prion protein NMR structures of chickens, turtles, and frogs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2005**;102(3):651-5. doi:10.1073/pnas.0408939102.
114. **Gill AC, Castle AR.** The cellular and pathologic prion protein. *Handb Clin Neurol.* **2018**;153:21-44. doi: 10.1016/B978-0-444-63945-5.00002-7.
115. **Sarnataro D, Pepe A, Zurzolo C.** Cell Biology of Prion Protein. *Prog Mol Biol Transl Sci.* **2017**;150:57-82. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.06.018.
116. **Caughey B, Race RE, Ernst D, Buchmeier MJ, Chesebro B.** Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. *J Virol.* **1989**;63(1):175-81.
117. **Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K, Prusiner SB.** Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell.* **1987**;51(2):229-40. doi: 0092-8674(87)90150-4.
118. **Puig B, Altmeppen H, Glatzel M.** The GPI-anchoring of PrP. *Prion.* **2014**;8(1):11-8. doi: 10.4161/pri.27892.
119. **Stahl N, Baldwin MA, Hecker R, Pan KM, Burlingame AL, Prusiner SB.** Glycosylphospholipid anchors of the scrapie and cellular prion proteins contain sialic acid. *Biochemistry.* **1992**;31(21):5043-53.
120. **Bate C, Nolan W, Williams A.** Sialic Acid on the Glycosylphosphatidylinositol Anchor Regulates PrP-mediated Cell Signaling and Prion Formation. *J Biol Chem.* **2016**;291(1):160-70. doi: 10.1074/jbc.M115.672394.
121. **Bate C, Nolan W, McHale-Owen H, Williams A.** Sialic Acid within the Glycosylphosphatidylinositol Anchor Targets the Cellular Prion Protein to Synapses. *J Biol Chem.* **2016**;291(33):17093-101. doi: 10.1074/jbc.M116.731117.
122. **Katorcha E, Srivastava S, Klimova N, Baskakov IV.** Sialylation of Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Anchors of Mammalian Prions Is Regulated in a Host-, Tissue-, and Cell-specific Manner. *J Biol Chem.* **2016**;291(33):17009-19. doi: 10.1074/jbc.M116.732040.
123. **Naslavsky N, Stein R, Yanai A, Friedlander G, Taraboulos A.** Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform. *J Biol Chem.* **1997**;272(10):6324-31.
124. **Taylor DR, Watt NT, Perera WS, Hooper NM.** Assigning functions to distinct regions of the N-terminus of the prion protein that are involved in its copper-stimulated, clathrin-dependent endocytosis. *J Cell Sci.* **2005**;118(Pt 21):5141-53. doi: 10.1242/jcs.02627.
125. **Peters PJ, Mironov A, Jr., Peretz D, van Donselaar E, Leclerc E, Erpel S, et al.** Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. *J Cell Biol.* **2003**;162(4):703-17. doi: 10.1083/jcb.200304140.
126. **Riek R, Hornemann S, Wider G, Glockshuber R, Wuthrich K.** NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett.* **1997**;413(2):282-8. doi: S0014-5793(97)00920-4.
127. **Riek R, Wider G, Billeter M, Hornemann S, Glockshuber R, Wuthrich K.** Prion protein NMR structure and familial human spongiform encephalopathies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1998**;95(20):11667-72.
128. **Sunyach C, Jen A, Deng J, Fitzgerald KT, Frobert Y, Grassi J, et al.** The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *EMBO J.* **2003**;22(14):3591-601. doi: 10.1093/emboj/cdg344.

129. **Wopfner F, Weidenhofer G, Schneider R, von Brunn A, Gilch S, Schwarz TF, et al.** Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *J Mol Biol.* **1999**;289(5):1163-78. doi: 10.1006/jmbi.1999.2831.
130. **Zahn R.** The octapeptide repeats in mammalian prion protein constitute a pH-dependent folding and aggregation site. *J Mol Biol.* **2003**;334(3):477-88. doi: S0022283603012014 [pii].
131. **Hornshaw MP, McDermott JR, Candy JM, Lakey JH.** Copper binding to the N-terminal tandem repeat region of mammalian and avian prion protein: structural studies using synthetic peptides. *Biochem Biophys Res Commun.* **1995**;214(3):993-9. doi: 10.1006/bbrc.1995.2384.
132. **Walter ED, Stevens DJ, Visconte MP, Millhauser GL.** The prion protein is a combined zinc and copper binding protein: Zn²⁺ alters the distribution of Cu²⁺ coordination modes. *J Am Chem Soc.* **2007**;129(50):15440-1. doi: 10.1021/ja077146j.
133. **Salzano G, Giachin G, Legname G.** Structural Consequences of Copper Binding to the Prion Protein. *Cells.* **2019**;8(8). doi: 10.3390/cells8080770.
134. **Warner RG, Hundt C, Weiss S, Turnbull JE.** Identification of the heparan sulfate binding sites in the cellular prion protein. *J Biol Chem.* **2002**;277(21):18421-30. doi: 10.1074/jbc.M110406200.
135. **Maiza A, Chantepie S, Vera C, Fifre A, Huynh MB, Stettler O, et al.** The role of heparan sulfates in protein aggregation and their potential impact on neurodegeneration. *FEBS Lett.* **2018**;592(23):3806-18. doi: 10.1002/1873-3468.13082.
136. **Christen B, Damberger FF, Perez DR, Hornemann S, Wuthrich K.** Structural plasticity of the cellular prion protein and implications in health and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2013**;110(21):8549-54. doi: 10.1073/pnas.1306178110.
137. **Bett C, Fernandez-Borges N, Kurt TD, Lucero M, Nilsson KP, Castilla J, et al.** Structure of the beta2-alpha2 loop and interspecies prion transmission. *FASEB J.* **2012**;26(7):2868-76. doi: 10.1096/fj.11-200923.
138. **Sigurdson CJ, Joshi-Barr S, Bett C, Winson O, Manco G, Schwarz P, et al.** Spongiform encephalopathy in transgenic mice expressing a point mutation in the beta2-alpha2 loop of the prion protein. *J Neurosci.* **2011**;31(39):13840-7. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3504-11.2011.
139. **Mange A, Nishida N, Milhavet O, McMahon HE, Casanova D, Lehmann S.** Amphotericin B inhibits the generation of the scrapie isoform of the prion protein in infected cultures. *J Virol.* **2000**;74(7):3135-40.
140. **Taraboulos A, Scott M, Semenov A, Avrahami D, Laszlo L, Prusiner SB.** Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J Cell Biol.* **1995**;129(1):121-32.
141. **Chesebro B, Trifilo M, Race R, Meade-White K, Teng C, LaCasse R, et al.** Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science.* **2005**;308(5727):1435-9. doi: 10.1126/science.1110837.
142. **Sandberg MK, Al-Doujaily H, Sharps B, Clarke AR, Collinge J.** Prion propagation and toxicity in vivo occur in two distinct mechanistic phases. *Nature.* **2011**;470(7335):540-2. doi: 10.1038/nature09768.
143. **Lewis PA, Properzi F, Prodromidou K, Clarke AR, Collinge J, Jackson GS.** Removal of the glycosylphosphatidylinositol anchor from PrP(Sc) by cathepsin D does not reduce prion infectivity. *Biochem J.* **2006**;395(2):443-8. doi: 10.1042/BJ20051677.
144. **Wulf MA, Senatore A, Aguzzi A.** The biological function of the cellular prion protein: an update. *BMC Biol.* **2017**;15(1):34. doi: 10.1186/s12915-017-0375-5.
145. **Chesebro B, Race B, Meade-White K, Lacasse R, Race R, Klingeborn M, et al.** Fatal transmissible amyloid encephalopathy: a new type of prion disease associated with lack of prion protein membrane anchoring. *PLoS Pathog.* **2010**;6(3):e1000800. doi: 10.1371/journal.ppat.1000800.
146. **Brandner S, Isenmann S, Raeber A, Fischer M, Sailer A, Kobayashi Y, et al.** Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature.* **1996**;379(6563):339-43. doi: 10.1038/379339a0.
147. **Sarell CJ, Quarterman E, Yip DC, Terry C, Nicoll AJ, Wadsworth JDF, et al.** Soluble Abeta aggregates can inhibit prion propagation. *Open Biol.* **2017**;7(11). doi: 10.1098/rsob.170158.

148. **Ferreira DG, Temido-Ferreira M, Vicente Miranda H, Batalha VL, Coelho JE, Szego EM, et al.** alpha-synuclein interacts with PrP(C) to induce cognitive impairment through mGluR5 and NMDAR2B. *Nat Neurosci.* **2017**;20(11):1569-79. doi: 10.1038/nn.4648.
149. **Castle AR, Gill AC.** Physiological Functions of the Cellular Prion Protein. *Front Mol Biosci.* **2017**;4:19. doi: 10.3389/fmolb.2017.00019.
150. **Martin-Lannere S, Halliez S, Hirsch TZ, Hernandez-Rapp J, Passet B, Tomkiewicz C, et al.** The Cellular Prion Protein Controls Notch Signaling in Neural Stem/Progenitor Cells. *Stem Cells.* **2017**;35(3):754-65. doi: 10.1002/stem.2501.
151. **Bremer J, Baumann F, Tiberi C, Wessig C, Fischer H, Schwarz P, et al.** Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance. *Nat Neurosci.* **2010**;13(3):310-8. doi: 10.1038/nn.2483.
152. **Kuffer A, Lakkaraju AK, Mogha A, Petersen SC, Airich K, Doucerain C, et al.** The prion protein is an agonistic ligand of the G protein-coupled receptor Adgrg6. *Nature.* **2016**;536(7617):464-8. doi: 10.1038/nature19312.
153. **Requena JR, Wille H.** The structure of the infectious prion protein. *Prion.* **2014**;8(1):60-6. doi: 10.4161/pri.28368.
154. **Bartz JC.** Prion Strain Diversity. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **2016**;6(12). doi: 10.1101/cshperspect.a024349.
155. **Silveira JR, Raymond GJ, Hughson AG, Race RE, Sim VL, Hayes SF, et al.** The most infectious prion protein particles. *Nature.* **2005**;437(7056):257-61. doi: 10.1038/nature03989.
156. **Gouras GK, Olsson TT, Hansson O.** beta-Amyloid peptides and amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics.* **2015**;12(1):3-11. doi: 10.1007/s13311-014-0313-y.
157. **Viola KL, Klein WL.** Amyloid beta oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. *Acta Neuropathol.* **2015**;129(2):183-206. doi: 10.1007/s00401-015-1386-3.
158. **Luciunaite A, McManus RM, Jankunec M, Racz I, Dansokho C, Dalgediene I, et al.** Soluble Aβ oligomers and protofibrils induce NLRP3 inflammasome activation in microglia. *J Neurochem.* **2019**;e14945. doi: 10.1111/jnc.14945.
159. **Caughey B, Baron GS, Chesebro B, Jeffrey M.** Getting a grip on prions: oligomers, amyloids, and pathological membrane interactions. *Annu Rev Biochem.* **2009**;78:177-204. doi: 10.1146/annurev.biochem.78.082907.145410.
160. **Meier P, Genoud N, Prinz M, Maissen M, Rulicke T, Zurbriggen A, et al.** Soluble dimeric prion protein binds PrP(Sc) in vivo and antagonizes prion disease. *Cell.* **2003**;113(1):49-60. doi: S0092867403002010.
161. **Prusiner SB, Scott M, Foster D, Pan KM, Groth D, Mirinda C, et al.** Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell.* **1990**;63(4):673-86. doi: 0092-8674(90)90134-Z [pii].
162. **Horiuchi M, Priola SA, Chabry J, Caughey B.** Interactions between heterologous forms of prion protein: binding, inhibition of conversion, and species barriers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2000**;97(11):5836-41. doi: 10.1073/pnas.110523897.
163. **Prusiner SB.** Molecular biology of prion diseases. *Science.* **1991**;252(5012):1515-22.
164. **Jarrett JT, Lansbury PT, Jr.** Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell.* **1993**;73(6):1055-8. doi: 0092-8674(93)90635-4.
165. **Abid K, Soto C.** The intriguing prion disorders. *Cell Mol Life Sci.* **2006**;63(19-20):2342-51. doi: 10.1007/s00018-006-6140-5.
166. **Wang F, Wang X, Yuan CG, Ma J.** Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein. *Science.* **2005**;307(5969):1132-5. doi: 10.1126/science.1183748.
167. **Zukas AA, Bruederle CE, Carter JM.** Sonication induced intermediate in prion protein conversion. *Protein Pept Lett.* **2008**;15(2):206-11.
168. **Masel J, Jansen VA.** The measured level of prion infectivity varies in a predictable way according to the aggregation state of the infectious agent. *Biochim Biophys Acta.* **2001**;1535(2):164-73. doi: S0925-4439(00)00095-8.
169. **van der Wel PCA.** Insights into protein misfolding and aggregation enabled by solid-state NMR spectroscopy. *Solid State Nucl Magn Reson.* **2017**;88:1-14. doi: 10.1016/j.ssnmr.2017.10.001.

170. **Baskakov IV, Caughey B, Requena JR, Sevillano AM, Surewicz WK, Wille H.** The prion 2018 round tables (I): the structure of PrP(Sc). *Prion*. **2019**;13(1):46-52. doi: 10.1080/19336896.2019.1569450.
171. **Gabizon R, McKinley MP, Prusiner SB.** Purified prion proteins and scrapie infectivity copartition into liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1987**;84(12):4017-21.
172. **Diringer H, Beekes M, Ozel M, Simon D, Queck I, Cardone F, et al.** Highly infectious purified preparations of disease-specific amyloid of transmissible spongiform encephalopathies are not devoid of nucleic acids of viral size. *Intervirol*. **1997**;40(4):238-46.
173. **Diaz-Espinoza R, Soto C.** High-resolution structure of infectious prion protein: the final frontier. *Nat Struct Mol Biol*. **2012**;19(4):370-7. doi: 10.1038/nsmb.2266.
174. **Beringue V, Vilotte JL, Laude H.** Prion agent diversity and species barrier. *Vet Res*. **2008**;39(4):47. doi: 10.1051/vetres:2008024.
175. **Hornemann S, Korth C, Oesch B, Riek R, Wider G, Wuthrich K, et al.** Recombinant full-length murine prion protein, mPrP(23-231): purification and spectroscopic characterization. *FEBS Lett*. **1997**;413(2):277-81. doi: S0014-5793(97)00921-6.
176. **Charco JM, Erana H, Venegas V, Garcia-Martinez S, Lopez-Moreno R, Gonzalez-Miranda E, et al.** Recombinant PrP and Its Contribution to Research on Transmissible Spongiform Encephalopathies. *Pathogens*. **2017**;6(4). doi: 10.3390/pathogens6040067.
177. **Wang F, Wang X, Orru CD, Groveman BR, Surewicz K, Abskharon R, et al.** Self-propagating, protease-resistant, recombinant prion protein conformers with or without in vivo pathogenicity. *PLoS Pathog*. **2017**;13(7):e1006491. doi: 10.1371/journal.ppat.1006491.
178. **Rezaei H.** Prion protein oligomerization. *Curr Alzheimer Res*. **2008**;5(6):572-8.
179. **Makarava N, Baskakov IV.** The same primary structure of the prion protein yields two distinct self-propagating states. *J Biol Chem*. **2008**;283(23):15988-96. doi: 10.1074/jbc.M800562200.
180. **Eisenberg DS, Sawaya MR.** Structural Studies of Amyloid Proteins at the Molecular Level. *Annu Rev Biochem*. **2017**;86:69-95. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-045104.
181. **Safar J, Roller PP, Gajdusek DC, Gibbs CJ, Jr.** Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein. *J Biol Chem*. **1993**;268(27):20276-84.
182. **Wille H, Requena JR.** The Structure of PrP(Sc) Prions. *Pathogens*. **2018**;7(1). doi: 10.3390/pathogens7010020.
183. **Groveman BR, Dolan MA, Taubner LM, Kraus A, Wickner RB, Caughey B.** Parallel in-register intermolecular beta-sheet architectures for prion-seeded prion protein (PrP) amyloids. *J Biol Chem*. **2014**;289(35):24129-42. doi: 10.1074/jbc.M114.578344.
184. **Aucouturier P, Kascsak RJ, Frangione B, Wisniewski T.** Biochemical and conformational variability of human prion strains in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett*. **1999**;274(1):33-6. doi: S0304-3940(99)00659-X.
185. **Caughey B, Raymond GJ, Bessen RA.** Strain-dependent differences in beta-sheet conformations of abnormal prion protein. *J Biol Chem*. **1998**;273(48):32230-5.
186. **Baron GS, Hughson AG, Raymond GJ, Offerdahl DK, Barton KA, Raymond LD, et al.** Effect of glycans and the glycoposphatidylinositol anchor on strain dependent conformations of scrapie prion protein: improved purifications and infrared spectra. *Biochemistry*. **2011**;50(21):4479-90. doi: 10.1021/bi2003907.
187. **Sevillano AM, Fernandez-Borges N, Younas N, Wang F, S RE, Bravo S, et al.** Recombinant PrPSc shares structural features with brain-derived PrPSc: Insights from limited proteolysis. *PLoS Pathog*. **2018**;14(1):e1006797. doi: 10.1371/journal.ppat.1006797.
188. **Cronier S, Gros N, Tattum MH, Jackson GS, Clarke AR, Collinge J, et al.** Detection and characterization of proteinase K-sensitive disease-related prion protein with thermolysin. *Biochem J*. **2008**;416(2):297-305. doi:10.1042/BJ20081235.
189. **Williamson RA, Peretz D, Pinilla C, Ball H, Bastidas RB, Rozenshteyn R, et al.** Mapping the prion protein using recombinant antibodies. *J Virol*. **1998**;72(11):9413-8.
190. **McKinley MP, Braunfeld MB, Bellinger CG, Prusiner SB.** Molecular characteristics of prion rods purified from scrapie-infected hamster brains. *J Infect Dis*. **1986**;154(1):110-20.

191. **Sim VL, Caughey B.** Ultrastructures and strain comparison of under-glycosylated scrapie prion fibrils. *Neurobiol Aging*. **2009**;30(12):2031-42. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2008.02.016.
192. **Vazquez-Fernandez E, Vos MR, Afanasyev P, Cebey L, Sevillano AM, Vidal E, et al.** The Structural Architecture of an Infectious Mammalian Prion Using Electron Cryomicroscopy. *PLoS Pathog*. **2016**;12(9):e1005835. doi: 10.1371/journal.ppat.1005835.
193. **Zweckstetter M, Requena JR, Wille H.** Elucidating the structure of an infectious protein. *PLoS Pathog*. **2017**;13(4):e1006229. doi: 10.1371/journal.ppat.1006229.
194. **Eanes E, Glenner G.** X-ray diffraction studies on amyloid filaments. *J Histochem Cytochem*. **1968**;16(11):673-7.
195. **Wille H, Bian W, McDonald M, Kendall A, Colby DW, Bloch L, et al.** Natural and synthetic prion structure from X-ray fiber diffraction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2009**;106(40):16990-5. doi: 10.1073/pnas.0909006106.
196. **Theint T, Nadaud PS, Aucoin D, Helmus JJ, Pondaven SP, Surewicz K, et al.** Species-dependent structural polymorphism of Y145Stop prion protein amyloid revealed by solid-state NMR spectroscopy. *Nat Commun*. **2017**;8(1):753. doi: 10.1038/s41467-017-00794-z.
197. **Muller H, Brener O, Andreoletti O, Piechatzek T, Willbold D, Legname G, et al.** Progress towards structural understanding of infectious sheep PrP-amyloid. *Prion*. **2014**;8(5):344-58. doi: 10.4161/19336896.2014.983754.
198. **Aucoin D, Xia Y, Theint T, Nadaud PS, Surewicz K, Surewicz WK, et al.** Protein-solvent interfaces in human Y145Stop prion protein amyloid fibrils probed by paramagnetic solid-state NMR spectroscopy. *J Struct Biol*. **2018**. doi: 10.1016/j.jsb.2018.04.002.
199. **Smirnovas V, Baron GS, Offerdahl DK, Raymond GJ, Caughey B, Surewicz WK.** Structural organization of brain-derived mammalian prions examined by hydrogen-deuterium exchange. *Nat Struct Mol Biol*. **2011**;18(4):504-6. doi: 10.1038/nsmb.2035.
200. **Downing DT, Lazo ND.** Molecular modelling indicates that the pathological conformations of prion proteins might be beta-helical. *Biochem J*. **1999**;343 Pt 2:453-60.
201. **DeMarco ML, Daggett V.** From conversion to aggregation: protofibril formation of the prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2004**;101(8):2293-8. doi: 10.1073/pnas.0706522104.
202. **Cobb NJ, Sonnichsen FD, McHaourab H, Surewicz WK.** Molecular architecture of human prion protein amyloid: a parallel, in-register beta-structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2007**;104(48):18946-51. doi: 10.1073/pnas.0706522104.
203. **Tycko R, Savtchenko R, Ostapchenko VG, Makarava N, Baskakov IV.** The alpha-helical C-terminal domain of full-length recombinant PrP converts to an in-register parallel beta-sheet structure in PrP fibrils: evidence from solid state nuclear magnetic resonance. *Biochemistry*. **2010**;49(44):9488-97. doi: 10.1021/bi1013134.
204. **Theint T, Nadaud PS, Surewicz K, Surewicz WK, Jaroniec CP.** (13)C and (15)N chemical shift assignments of mammalian Y145Stop prion protein amyloid fibrils. *Biomol NMR Assign*. **2017**;11(1):75-80. doi: 10.1007/s12104-016-9723-6.
205. **Silva CJ, Vazquez-Fernandez E, Onisko B, Requena JR.** Proteinase K and the structure of PrPSc: The good, the bad and the ugly. *Virus Res*. **2015**;207:120-6. doi: 10.1016/j.virusres.2015.03.008.
206. **Spagnolli G, Rigoli M, Orioli S, Sevillano AM, Faccioli P, Wille H, et al.** Full atomistic model of prion structure and conversion. *PLoS Pathog*. **2019**;15(7):e1007864. doi: 10.1371/journal.ppat.1007864.
207. **Halliday M, Radford H, Mallucci GR.** Prions: generation and spread versus neurotoxicity. *J Biol Chem*. **2014**;289(29):19862-8. doi: 10.1074/jbc.R114.568477.
208. **Bueler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, et al.** Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*. **1993**;73(7):1339-47. doi: 10.1016/0092-8674(93)90360-3.
209. **Manson JC, Clarke AR, Hooper ML, Aitchison L, McConnell I, Hope J.** 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol*. **1994**;8(2-3):121-7. doi: 10.1007/BF02780662.

210. **Mallucci GR, White MD, Farmer M, Dickinson A, Khatun H, Powell AD, et al.** Targeting cellular prion protein reverses early cognitive deficits and neurophysiological dysfunction in prion-infected mice. *Neuron*. **2007**;53(3):325-35. doi: 10.1016/j.neuron.2007.01.005.
211. **Owen F, Poulter M, Shah T, Collinge J, Lofthouse R, Baker H, et al.** An in-frame insertion in the prion protein gene in familial Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res Mol Brain Res*. **1990**;7(3):273-6.
212. **Baskakov IV, Legname G, Baldwin MA, Prusiner SB, Cohen FE.** Pathway complexity of prion protein assembly into amyloid. *J Biol Chem*. **2002**;277(24):21140-8. doi: 10.1074/jbc.M111402200.
213. **Kazlauskaitė J, Young A, Gardner CE, Macpherson JV, Venien-Bryan C, Pinheiro TJ.** An unusual soluble beta-turn-rich conformation of prion is involved in fibril formation and toxic to neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. **2005**;328(1):292-305. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.12.172.
214. **Simoneau S, Rezaei H, Sales N, Kaiser-Schulz G, Lefebvre-Roque M, Vidal C, et al.** In vitro and in vivo neurotoxicity of prion protein oligomers. *PLoS Pathog*. **2007**;3(8):e125. doi: 10.1371/journal.ppat.0030125.
215. **Ugalde CL, Finkelstein DI, Lawson VA, Hill AF.** Pathogenic mechanisms of prion protein, amyloid-beta and alpha-synuclein misfolding: the prion concept and neurotoxicity of protein oligomers. *J Neurochem*. **2016**;139(2):162-80. doi: 10.1111/jnc.13772.
216. **Younan ND, Chen KF, Rose RS, Crowther DC, Viles JH.** Prion protein stabilizes amyloid-beta (A β) oligomers and enhances A β neurotoxicity in a *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *J Biol Chem*. **2018**;293(34):13090-9. doi: 10.1074/jbc.RA118.003319.
217. **Bett C, Lawrence J, Kurt TD, Orru C, Aguilar-Calvo P, Kincaid AE, et al.** Enhanced neuroinvasion by smaller, soluble prions. *Acta Neuropathol Commun*. **2017**;5(1):32. doi: 10.1186/s40478-017-0430-z.
218. **Collinge J, Whitfield J, McKintosh E, Beck J, Mead S, Thomas DJ, et al.** Kuru in the 21st century--an acquired human prion disease with very long incubation periods. *Lancet*. **2006**;367(9528):2068-74. doi: 10.1016/S0140-6736(06)68930-7.
219. **Anderson RM, Donnelly CA, Ferguson NM, Woolhouse ME, Watt CJ, Udy HJ, et al.** Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature*. **1996**;382(6594):779-88. doi: 10.1038/382779a0.
220. **Hilton DA.** Pathogenesis and prevalence of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Pathol*. **2006**;208(2):134-41. doi: 10.1002/path.1880.
221. **Hoover CE, Davenport K, Henderson DM, Denkers N, Mathiason CK, Soto C, et al.** Pathways of Prion Spread During Early Chronic Wasting Disease in Deer. *Journal of Virology*. **2017**;91(10):e00077-17. doi: 10.1128/JVI.00077-17
222. **Kimberlin RH, Walker CA.** Pathogenesis of mouse scrapie: effect of route of inoculation on infectivity titres and dose-response curves. *J Comp Pathol*. **1978**;88(1):39-47. doi: 0021-9975(78)90059-2.
223. **Fraser H.** Neuronal spread of scrapie agent and targeting of lesions within the retino-tectal pathway. *Nature*. **1982**;295(5845):149-50.
224. **Aguzzi A, Nuvolone M, Zhu C.** The immunobiology of prion diseases. *Nat Rev Immunol*. **2013**;13(12):888-902. doi: 10.1038/nri3553.
225. **Prinz M, Huber G, Macpherson AJ, Heppner FL, Glatzel M, Eugster HP, et al.** Oral prion infection requires normal numbers of Peyer's patches but not of enteric lymphocytes. *Am J Pathol*. **2003**;162(4):1103-11. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63907-7.
226. **Donaldson DS, Kobayashi A, Ohno H, Yagita H, Williams IR, Mabbott NA.** M cell-depletion blocks oral prion disease pathogenesis. *Mucosal Immunol*. **2012**;5(2):216-25. doi: 10.1038/mi.2011.68.
227. **Kujala P, Raymond CR, Romeijn M, Godsave SF, van Kasteren SI, Wille H, et al.** Prion uptake in the gut: identification of the first uptake and replication sites. *PLoS Pathog*. **2011**;7(12):e1002449. doi: 10.1371/journal.ppat.1002449.
228. **Mishra RS, Basu S, Gu Y, Luo X, Zou WQ, Mishra R, et al.** Protease-resistant human prion protein and ferritin are cotransported across Caco-2 epithelial cells: implications for species barrier in prion uptake from the intestine. *J Neurosci*. **2004**;24(50):11280-90. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2864-04.2004.

229. **Morel E, Andrieu T, Casagrande F, Gauczynski S, Weiss S, Grassi J, et al.** Bovine prion is endocytosed by human enterocytes via the 37 kDa/67 kDa laminin receptor. *Am J Pathol.* **2005**;167(4):1033-42. doi: 10.1016/S0002-9440(10)61192-3.
230. **Marshall A, Bradford BM, Clarke AR, Manson JC, Mabbott NA.** Oral prion neuroinvasion occurs independently of PrP(C) expression in the gut epithelium. *J Virol.* **2018.** doi: 10.1128/JVI.01010-18.
231. **Sigurdson CJ, Heikenwalder M, Manco G, Barthel M, Schwarz P, Stecher B, et al.** Bacterial colitis increases susceptibility to oral prion disease. *J Infect Dis.* **2009**;199(2):243-52. doi: 10.1086/595791.
232. **Glatzel M, Heppner FL, Albers KM, Aguzzi A.** Sympathetic innervation of lymphoreticular organs is rate limiting for prion neuroinvasion. *Neuron.* **2001**;31(1):25-34. doi: S0896-6273(01)00331-2.
233. **Prinz M, Heikenwalder M, Junt T, Schwarz P, Glatzel M, Heppner FL, et al.** Positioning of follicular dendritic cells within the spleen controls prion neuroinvasion. *Nature.* **2003**;425(6961):957-62. doi: 10.1038/nature02072.
234. **Kimberlin RH, Field HJ, Walker CA.** Pathogenesis of mouse scrapie: evidence for spread of infection from central to peripheral nervous system. *J Gen Virol.* **1983**;64 Pt 3:713-6.
235. **Maddox RA, Belay ED, Curns AT, Zou WQ, Nowicki S, Lembach RG, et al.** Creutzfeldt-Jakob disease in recipients of corneal transplants. *Cornea.* **2008**;27(7):851-4. doi: 10.1097/ICO.0b013e31816a628d.
236. **Bartz JC, Dejoia C, Tucker T, Kincaid AE, Bessen RA.** Extraneural prion neuroinvasion without lymphoreticular system infection. *J Virol.* **2005**;79(18):11858-63. doi: 10.1128/JVI.79.18.11858-11863.2005.
237. **Bartz JC, Kincaid AE, Bessen RA.** Rapid prion neuroinvasion following tongue infection. *J Virol.* **2003**;77(1):583-91.
238. **Fraser H, Dickinson AG.** Pathogenesis of scrapie in the mouse: the role of the spleen. *Nature.* **1970**;226(5244):462-3.
239. **Pattison IH, Millson GC.** Distribution of the scrapie agent in the tissues of experimentally inoculated goats. *J Comp Pathol.* **1962**;72:233-44.
240. **Cashman NR, Loertscher R, Nalbantoglu J, Shaw I, Kascsak RJ, Bolton DC, et al.** Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell.* **1990**;61(1):185-92. doi: 0092-8674(90)90225-4.
241. **Kitamoto T, Muramoto T, Mohri S, Doh-Ura K, Tateishi J.** Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Virol.* **1991**;65(11):6292-5.
242. **Aguzzi A.** Peripheral prion pursuit. *J Clin Invest.* **2001**;108(5):661-2. doi: 10.1172/JCI13919.
243. **Shlomchik MJ, Radebold K, Duclos N, Manuelidis L.** Neuroinvasion by a Creutzfeldt-Jakob disease agent in the absence of B cells and follicular dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2001**;98(16):9289-94. doi: 10.1073/pnas.161055198.
244. **Kraus A, Groveman BR, Caughey B.** Prions and the potential transmissibility of protein misfolding diseases. *Annu Rev Microbiol.* **2013**;67:543-64. doi: 10.1146/annurev-micro-092412-155735.
245. **Aguzzi A, Zhu C.** Microglia in prion diseases. *J Clin Invest.* **2017**;127(9):3230-9. doi: 10.1172/JCI90605.
246. **Carroll JA, Race B, Williams K, Striebel J, Chesebro B.** Microglia Are Critical in Host Defense Against Prion Disease. *J Virol.* **2018.** doi: 10.1128/JVI.00549-18.
247. **Rossi M, Baiardi S, Parchi P.** Understanding Prion Strains: Evidence from Studies of the Disease Forms Affecting Humans. *Viruses.* **2019**;11(4). doi: 10.3390/v11040309.
248. **Jones EM, Surewicz WK.** Fibril conformation as the basis of species- and strain-dependent seeding specificity of mammalian prion amyloids. *Cell.* **2005**;121(1):63-72. doi: 10.1016/j.cell.2005.01.034.

249. **Bruce ME, Fraser H.** Scrapie strain variation and its implications. *Curr Top Microbiol Immunol.* **1991**;172:125-38.
250. **Scialo C, De Cecco E, Manganotti P, Legname G.** Prion and Prion-Like Protein Strains: Deciphering the Molecular Basis of Heterogeneity in Neurodegeneration. *Viruses.* **2019**;11(3). doi: 10.3390/v11030261.
251. **Bessen RA, Marsh RF.** Identification of two biologically distinct strains of transmissible mink encephalopathy in hamsters. *J Gen Virol.* **1992**;73 (Pt 2):329-34.
252. **Bessen RA, Marsh RF.** Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J Virol.* **1994**;68(12):7859-68.
253. **Race RE, Raines A, Baron TG, Miller MW, Jenny A, Williams ES.** Comparison of abnormal prion protein glycoform patterns from transmissible spongiform encephalopathy agent-infected deer, elk, sheep, and cattle. *J Virol.* **2002**;76(23):12365-8.
254. **Tagliavini F, Lievens PM, Tranchant C, Warter JM, Mohr M, Giaccone G, et al.** A 7-kDa prion protein (PrP) fragment, an integral component of the PrP region required for infectivity, is the major amyloid protein in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease A117V. *J Biol Chem.* **2001**;276(8):6009-15. doi: 10.1074/jbc.M007062200.
255. **Benestad SL, Sarradin P, Thu B, Schonheit J, Tranulis MA, Bratberg B.** Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet Rec.* **2003**;153(7):202-8.
256. **Balkema-Buschmann A, Fast C, Kaatz M, Eiden M, Ziegler U, McIntyre L, et al.** Pathogenesis of classical and atypical BSE in cattle. *Prev Vet Med.* **2011**;102(2):112-7. doi: 10.1016/j.prevetmed.2011.04.006.
257. **Mahal SP, Baker CA, Demczyk CA, Smith EW, Julius C, Weissmann C.** Prion strain discrimination in cell culture: the cell panel assay. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2007**;104(52):20908-13. doi: 10.1073/pnas.0710054104.
258. **Fernández-Borges N, Di Bari MA, Erana H, Sanchez-Martin M, Pirisinu L, Parra B, et al.** Cofactors influence the biological properties of infectious recombinant prions. *Acta Neuropathol.* **2017**. doi: 10.1007/s00401-017-1782-y.
259. **Aguzzi A, Heikenwalder M, Polymenidou M.** Insights into prion strains and neurotoxicity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2007**;8(7):552-61. doi: 10.1038/nrm2204.
260. **Collinge J, Sidle KC, Meads J, Ironside J, Hill AF.** Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature.* **1996**;383(6602):685-90. doi: 10.1038/383685a0.
261. **Collinge J.** Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci.* **2001**;24:519-50. doi: 10.1146/annurev.neuro.24.1.519.
262. **Moreno JA, Telling GC.** Insights into Mechanisms of Transmission and Pathogenesis from Transgenic Mouse Models of Prion Diseases. *Methods Mol Biol.* **2017**;1658:219-52. doi: 10.1007/978-1-4939-7244-9_16.
263. **Dickinson AG.** Scrapie in sheep and goats. *Front Biol.* **1976**;44:209-41.
264. **Cassard H, Torres JM, Lacroux C, Douet JY, Benestad SL, Lantier F, et al.** Evidence for zoonotic potential of ovine scrapie prions. *Nat Commun.* **2014**;5:5821. doi: 10.1038/ncomms6821.
265. **Comoy EE, Mikol J, Luccantoni-Freire S, Correia E, Lescoutra-Etcheagaray N, Durand V, et al.** Transmission of scrapie prions to primate after an extended silent incubation period. *Sci Rep.* **2015**;5:11573. doi: 10.1038/srep11573.
266. **Race B, Williams K, Orru CD, Hughson AG, Lubke L, Chesebro B.** Lack of Transmission of Chronic Wasting Disease to Cynomolgus Macaques. *J Virol.* **2018**. doi: 10.1128/JVI.00550-18.
267. **Scott M, Groth D, Foster D, Torchia M, Yang SL, DeArmond SJ, et al.** Propagation of prions with artificial properties in transgenic mice expressing chimeric PrP genes. *Cell.* **1993**;73(5):979-88. doi: 0092-8674(93)90275-U.
268. **Fernandez-Borges N, de Castro J, Castilla J.** In vitro studies of the transmission barrier. *Prion.* **2009**;3(4):220-3. doi: 10.4161/pri.3.4.10500 .
269. **Carlson GA, Goodman PA, Lovett M, Taylor BA, Marshall ST, Peterson-Torchia M, et al.** Genetics and polymorphism of the mouse prion gene complex: control of scrapie incubation time. *Mol Cell Biol.* **1988**;8(12):5528-40.

270. **Laude H, Vilette D, Le Dur A, Archer F, Soulier S, Besnard N, et al.** New in vivo and ex vivo models for the experimental study of sheep scrapie: development and perspectives. *C R Biol.* **2002**;325(1):49-57.
271. **Takada LT, Kim MO, Metcalf S, Gala, II, Geschwind MD.** Prion disease. *Handb Clin Neurol.* **2018**;148:441-64. doi: 10.1016/B978-0-444-64076-5.00029-6.
272. **Brandel JP, Preece M, Brown P, Croes E, Laplanche JL, Agid Y, et al.** Distribution of codon 129 genotype in human growth hormone-treated CJD patients in France and the UK. *Lancet.* **2003**;362(9378):128-30. doi: 10.1016/S0140-6736(03)13867-6.
273. **Will RG, Cousens SN, Farrington CP, Smith PG, Knight RSG, Ironside JW.** Deaths from variant Creutzfeldt-Jakob disease. *The Lancet.* **1999**;353(9157):979. doi: 10.1016/S0140-6736(99)01160-5.
274. **Mok T, Jaunmuktane Z, Joiner S, Campbell T, Morgan C, Wakerley B, et al.** Variant Creutzfeldt-Jakob Disease in a Patient with Heterozygosity at PRNP Codon 129. *New England Journal of Medicine.* **2017**;376(3):292-4. doi: 10.1056/NEJMc1610003.
275. **Collinge J, Palmer MS, Sidle KC, Gowland I, Medori R, Ironside J, et al.** Transmission of fatal familial insomnia to laboratory animals. *Lancet.* **1995**;346(8974):569-70.
276. **Fraser H, Bruce ME, Chree A, McConnell I, Wells GA.** Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice. *J Gen Virol.* **1992**;73 (Pt 8):1891-7.
277. **Asante EA, Linehan JM, Desbruslais M, Joiner S, Gowland I, Wood AL, et al.** BSE prions propagate as either variant CJD-like or sporadic CJD-like prion strains in transgenic mice expressing human prion protein. *EMBO J.* **2002**;21(23):6358-66.
278. **Genomes Project C, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, et al.** A global reference for human genetic variation. *Nature.* **2015**;526(7571):68-74. doi: 10.1038/nature15393.
279. **Palmer MS, Dryden AJ, Hughes JT, Collinge J.** Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature.* **1991**;352(6333):340-2. doi: 10.1038/352340a0.
280. **Parchi P, Capellari S, Chen SG, Petersen RB, Gambetti P, Kopp N, et al.** Typing prion isoforms. *Nature.* **1997**;386(6622):232-4. doi: 10.1038/386232a0.
281. **Parchi P, Strammiello R, Notari S, Giese A, Langeveld JP, Ladogana A, et al.** Incidence and spectrum of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease variants with mixed phenotype and co-occurrence of PrPSc types: an updated classification. *Acta Neuropathol.* **2009**;118(5):659-71. doi: 10.1007/s00401-009-0585-1.
282. **Belay ED.** Transmissible spongiform encephalopathies in humans. *Annu Rev Microbiol.* **1999**;53:283-314. doi: 10.1146/annurev.micro.53.1.283.
283. **Collins S, McLean CA, Masters CL.** Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome, fatal familial insomnia, and kuru: a review of these less common human transmissible spongiform encephalopathies. *J Clin Neurosci.* **2001**;8(5):387-97. doi: 10.1054/jocn.2001.0919.
284. **Brown P, Brandel JP, Sato T, Nakamura Y, MacKenzie J, Will RG, et al.** Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease, final assessment. *Emerg Infect Dis.* **2012**;18(6):901-7. doi: 10.3201/eid1806.120116.
285. **Bonda DJ, Manjila S, Mehndiratta P, Khan F, Miller BR, Onwuzulike K, et al.** Human prion diseases: surgical lessons learned from iatrogenic prion transmission. *Neurosurg Focus.* **2016**;41(1):E10. doi: 10.3171/2016.5.FOCUS15126.
286. **Turner ML.** Safety of blood, blood derivatives, and plasma-derived products. *Handb Clin Neurol.* **2018**;153:463-72. doi: 10.1016/B978-0-444-63945-5.00026-X.
287. **Minikel EV, Vallabh SM, Lek M, Estrada K, Samocha KE, Sathirapongsasuti JF, et al.** Quantifying prion disease penetrance using large population control cohorts. *Sci Transl Med.* **2016**;8(322). doi: 10.1126/scitranslmed.aad5169.
288. **Vorberg I, Chiesa R.** Experimental models to study prion disease pathogenesis and identify potential therapeutic compounds. *Curr Opin Pharmacol.* **2019**;44:28-38. doi: 10.1016/j.coph.2019.02.002.
289. **Race RE, Fadness LH, Chesebro B.** Characterization of scrapie infection in mouse neuroblastoma cells. *J Gen Virol.* **1987**;68 (Pt 5):1391-9.
290. **Priola SA.** Cell biology of prion infection. *Handb Clin Neurol.* **2018**;153:45-68. doi: 10.1016/B978-0-444-63945-5.00003-9.

291. **Oelschlegel AM, Geissen M, Lenk M, Riebe R, Angermann M, Schatzl H, et al.** A bovine cell line that can be infected by natural sheep scrapie prions. *PLoS One*. **2015**;10(1):e0117154. doi: 10.1371/journal.pone.0117154.
292. **Krauss S, Vorberg I.** Prions Ex Vivo: What Cell Culture Models Tell Us about Infectious Proteins. *Int J Cell Biol*. **2013**;2013:704546. doi: 10.1155/2013/704546.
293. **Barret A, Tagliavini F, Forloni G, Bate C, Salmona M, Colombo L, et al.** Evaluation of quinacrine treatment for prion diseases. *J Virol*. **2003**;77(15):8462-9.
294. **Massignan T, Cimini S, Stincardini C, Cerovic M, Vanni I, Elezgarai SR, et al.** A cationic tetrapyrrole inhibits toxic activities of the cellular prion protein. *Sci Rep*. **2016**;6:23180. doi: 10.1038/srep23180.
295. **Kocisko DA, Baron GS, Rubenstein R, Chen J, Kuizon S, Caughey B.** New inhibitors of scrapie-associated prion protein formation in a library of 2000 drugs and natural products. *J Virol*. **2003**;77(19):10288-94.
296. **Raymond GJ, Hope J, Kocisko DA, Priola SA, Raymond LD, Bossers A, et al.** Molecular assessment of the potential transmissibilities of BSE and scrapie to humans. *Nature*. **1997**;388(6639):285-8. doi: 10.1038/40876.
297. **Raymond GJ, Bossers A, Raymond LD, O'Rourke KI, McHolland LE, Bryant PK, 3rd, et al.** Evidence of a molecular barrier limiting susceptibility of humans, cattle and sheep to chronic wasting disease. *EMBO J*. **2000**;19(17):4425-30. doi: 10.1093/emboj/19.17.4425.
298. **Demaimay R, Chesebro B, Caughey B.** Inhibition of formation of protease-resistant prion protein by Trypan Blue, Sirius Red and other Congo Red analogs. *Arch Virol Suppl*. **2000**;16:277-83.
299. **Demaimay R, Harper J, Gordon H, Weaver D, Chesebro B, Caughey B.** Structural aspects of Congo red as an inhibitor of protease-resistant prion protein formation. *J Neurochem*. **1998**;71(6):2534-41.
300. **Caughey B, Raymond LD, Raymond GJ, Maxson L, Silveira J, Baron GS.** Inhibition of protease-resistant prion protein accumulation in vitro by curcumin. *J Virol*. **2003**;77(9):5499-502.
301. **Caughey WS, Raymond LD, Horiuchi M, Caughey B.** Inhibition of protease-resistant prion protein formation by porphyrins and phthalocyanines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1998**;95(21):12117-22. doi: 10.1073/pnas.95.21.12117 .
302. **Hill AF, Antoniou M, Collinge J.** Protease-resistant prion protein produced in vitro lacks detectable infectivity. *J Gen Virol*. **1999**;80 (Pt 1):11-4.
303. **Saa P, Castilla J, Soto C.** Cyclic amplification of protein misfolding and aggregation. *Methods Mol Biol*. **2005**;299:53-65. doi: 1-59259-874-9:053 [pii].
304. **Castilla J, Saa P, Morales R, Abid K, Maundrell K, Soto C.** Protein misfolding cyclic amplification for diagnosis and prion propagation studies. *Methods Enzymol*. **2006**;412:3-21. doi: 10.1016/S0076-6879(06)12001-7.
305. **Saa P, Castilla J, Soto C.** Ultra-efficient replication of infectious prions by automated protein misfolding cyclic amplification. *J Biol Chem*. **2006**;281(46):35245-52. doi: 10.1074/jbc.M603964200.
306. **Deleault NR, Lucassen RW, Supattapone S.** RNA molecules stimulate prion protein conversion. *Nature*. **2003**;425(6959):717-20. doi: 10.1038/nature01979.
307. **Burke CM, Walsh DJ, Mark KMK, Deleault NR, Nishina KA, Agrimi U, et al.** Cofactor and glycosylation preferences for in vitro prion conversion are predominantly determined by strain conformation. *PLoS Pathog*. **2020**;16(4):e1008495. doi: 10.1371/journal.ppat.1008495.
308. **Castilla J, Gonzalez-Romero D, Saa P, Morales R, De Castro J, Soto C.** Crossing the species barrier by PrP(Sc) replication in vitro generates unique infectious prions. *Cell*. **2008**;134(5):757-68. doi: 10.1016/j.cell.2008.07.030.
309. **Barria MA, Libori A, Mitchell G, Head MW.** Susceptibility of Human Prion Protein to Conversion by Chronic Wasting Disease Prions. *Emerg Infect Dis*. **2018**;24(8):1482-9. doi: 10.3201/eid2408.161888.
310. **Castilla J, Saa P, Soto C.** Detection of prions in blood. *Nat Med*. **2005**;11(9):982-5. doi: 10.1038/nm1286.

311. **Concha-Marambio L, Pritzkow S, Moda F, Tagliavini F, Ironside JW, Schulz PE, et al.** Detection of prions in blood from patients with variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Sci Transl Med.* **2016**;8(370). doi: 10.1126/scitranslmed.aaf6188.
312. **Moda F, Gambetti P, Notari S, Concha-Marambio L, Catania M, Park KW, et al.** Prions in the urine of patients with variant Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med.* **2014**;371(6):530-9. doi: 10.1056/NEJMoa1404401.
313. **Barria MA, Lee A, Green AJ, Knight R, Head MW.** Rapid amplification of prions from variant Creutzfeldt-Jakob disease cerebrospinal fluid. *J Pathol Clin Res.* **2018**;4(2):86-92. doi: 10.1002/cjp2.90.
314. **Soto C, Saborio GP, Anderes L.** Cyclic amplification of protein misfolding: application to prion-related disorders and beyond. *Trends Neurosci.* **2002**;25(8):390-4. doi: S0166-2236(02)02195-1.
315. **Deleault NR, Piro JR, Walsh DJ, Wang F, Ma J, Geoghegan JC, et al.** Isolation of phosphatidylethanolamine as a solitary cofactor for prion formation in the absence of nucleic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2012**;109(22):8546-51. doi: 10.1073/pnas.1204498109.
316. **Nicoll AJ, Trevitt CR, Tattum MH, Risse E, Quarterman E, Ibarra AA, et al.** Pharmacological chaperone for the structured domain of human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2010**;107(41):17610-5. doi: 10.1073/pnas.1009062107.
317. **Wilham JM, Orru CD, Bessen RA, Atarashi R, Sano K, Race B, et al.** Rapid end-point quantitation of prion seeding activity with sensitivity comparable to bioassays. *PLoS Pathog.* **2010**;6(12):e1001217. doi: 10.1371/journal.ppat.1001217.
318. **McGuire LI, Poleggi A, Poggiolini I, Suardi S, Grznarova K, Shi S, et al.** Cerebrospinal fluid real-time quaking-induced conversion is a robust and reliable test for sporadic creutzfeldt-jakob disease: An international study. *Ann Neurol.* **2016**;80(1):160-5. doi: 10.1002/ana.24679.
319. **Orru CD, Bongiani M, Tonoli G, Ferrari S, Hughson AG, Groveman BR, et al.** A test for Creutzfeldt-Jakob disease using nasal brushings. *N Engl J Med.* **2014**;371(6):519-29. doi: 10.1056/NEJMoa1315200.
320. **John TR, Schatzl HM, Gilch S.** Early detection of chronic wasting disease prions in urine of pre-symptomatic deer by real-time quaking-induced conversion assay. *Prion.* **2013**;7(3):253-8. doi: 10.4161/pri.24430.
321. **Cheng YC, Hannaoui S, John TR, Dudas S, Czub S, Gilch S.** Early and Non-Invasive Detection of Chronic Wasting Disease Prions in Elk Feces by Real-Time Quaking Induced Conversion. *PLoS One.* **2016**;11(11):e0166187. doi: 10.1371/journal.pone.0166187.
322. **Henderson DM, Denkers ND, Hoover CE, Garbino N, Mathiason CK, Hoover EA.** Longitudinal Detection of Prion Shedding in Saliva and Urine by Chronic Wasting Disease-Infected Deer by Real-Time Quaking-Induced Conversion. *J Virol.* **2015**;89(18):9338-47. doi: 10.1128/JVI.01118-15.
323. **Erana H, Charco JM, Gonzalez-Miranda E, Garcia-Martinez S, Lopez-Moreno R, Perez-Castro MA, et al.** Detection of Pathognomonic Biomarker PrP(Sc) and the Contribution of Cell Free-Amplification Techniques to the Diagnosis of Prion Diseases. *Biomolecules.* **2020**;10(3). doi: 10.3390/biom10030469.
324. **Saijo E, Groveman BR, Kraus A, Metrick M, Orru CD, Hughson AG, et al.** Ultrasensitive RT-QuIC Seed Amplification Assays for Disease-Associated Tau, alpha-Synuclein, and Prion Aggregates. *Methods Mol Biol.* **2019**;1873:19-37. doi: 10.1007/978-1-4939-8820-4_2.
325. **Groveman BR, Raymond GJ, Campbell KJ, Race B, Raymond LD, Hughson AG, et al.** Role of the central lysine cluster and scrapie templating in the transmissibility of synthetic prion protein aggregates. *PLoS Pathog.* **2017**;13(9):e1006623. doi: 10.1371/journal.ppat.1006623.
326. **Hyeon JW, Kim SY, Lee SM, Lee J, An SS, Lee MK, et al.** Anti-Prion Screening for Acridine, Dextran, and Tannic Acid using Real Time-Quaking Induced Conversion: A Comparison with PrPSc-Infected Cell Screening. *PLoS One.* **2017**;12(1):e0170266. doi: 10.1371/journal.pone.0170266.
327. **Ferreira NC, Ascari LM, Hughson AG, Cavalheiro GR, Goes CF, Fernandes PN, et al.** A Promising Antiprion Trimethoxychalcone Binds to the Globular Domain of the Cellular Prion Protein and Changes Its Cellular Location. *Antimicrob Agents Chemother.* **2018**;62(2). doi: 10.1128/AAC.01441-17.

328. **Berrow NS, Alderton D, Sainsbury S, Nettleship J, Assenberg R, Rahman N, et al.** A versatile ligation-independent cloning method suitable for high-throughput expression screening applications. *Nucleic Acids Res.* **2007**;35(6):e45. doi: 10.1093/nar/gkm047.
329. **do Carmo Ferreira N, Caughey B.** Cell-free prion protein conversion assays in screening for anti-prion drug candidates. *Curr Opin Pharmacol.* **2019**;44:1-7. doi: 10.1016/j.coph.2018.10.001.
330. **Erana H, Charco JM, Di Bari MA, Diaz-Dominguez CM, Lopez-Moreno R, Vidal E, et al.** Development of a new largely scalable in vitro prion propagation method for the production of infectious recombinant prions for high resolution structural studies. *PLoS Pathog.* **2019**;15(10):e1008117. doi: 10.1371/journal.ppat.1008117.
331. **Timmes AG, Moore RA, Fischer ER, Priola SA.** Recombinant prion protein refolded with lipid and RNA has the biochemical hallmarks of a prion but lacks in vivo infectivity. *PLoS One.* **2013**;8(7):e71081. doi: 10.1371/journal.pone.0071081.
332. **Charco JM.** Desarrollo de un nuevo sistema de cribado masivo basado en la propagación in vitro de priones recombinantes infecciosos para la detección de compuestos con actividad anti-priónica.: Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibersitate; **2018**.
333. **Aguzzi A, Lakkaraju AKK, Frontzek K.** Toward Therapy of Human Prion Diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **2018**;58:331-51. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010617-052745.
334. **Vallabh SM, Minikel EV, Schreiber SL, Lander ES.** Towards a treatment for genetic prion disease: trials and biomarkers. *The Lancet Neurology.* **2020**;19(4):361-8. doi: 10.1016/s1474-4422(19)30403-x.
335. **David AS, Grant R, Ballantyne JP.** Unsuccessful treatment of Creutzfeldt-Jakob disease with acyclovir. *Lancet.* **1984**;1(8375):512-3.
336. **Terzano MG, Montanari E, Calzetti S, Mancina D, Lechi A.** The effect of amantadine on arousal and EEG patterns in Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol.* **1983**;40(9):555-9.
337. **Kovanen J, Tiilikainen A, Haltia M.** Histocompatibility antigens in familial Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Sci.* **1980**;45(2-3):317-21.
338. **Dervaux A, Vicart S, Lopes F, Le Borgne MH.** [Psychiatric manifestations of a new variant of Creutzfeldt-Jakob disease. Apropos of a case]. *Encephale.* **2001**;27(2):194-7.
339. **Imperiale D, Bortolotto S, Cucatto A, Schiffer P, Cassano D, Buffa C.** Levetiracetam control of myoclonus in a patient with Creutzfeldt-Jakob disease. *Eur Neurol.* **2003**;49(3):189-90. doi: 10.1159/000069083.
340. **Otto M, Cepek L, Ratzka P, Doehlinger S, Boekhoff I, Wiltfang J, et al.** Efficacy of flupirtine on cognitive function in patients with CJD: A double-blind study. *Neurology.* **2004**;62(5):714-8.
341. **Teruya K, Doh-Ura K.** Insights from Therapeutic Studies for PrP Prion Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **2017**;7(3). doi: 10.1101/cshperspect.a024430.
342. **Frontzek K, Carta M, Losa M, Epskamp M, Meisl G, Anane A, et al.** Autoantibodies against the prion protein in individuals with PRNP mutations. *Neurology.* **2020**. doi: 10.1212/WNL.0000000000009183.
343. **Zhu C, Herrmann US, Falsig J, Abakumova I, Nuvolone M, Schwarz P, et al.** A neuroprotective role for microglia in prion diseases. *J Exp Med.* **2016**;213(6):1047-59. doi: 10.1084/jem.20151000.
344. **Gilch S, Wopfner F, Renner-Muller I, Kremmer E, Bauer C, Wolf E, et al.** Polyclonal anti-PrP auto-antibodies induced with dimeric PrP interfere efficiently with PrP^{Sc} propagation in prion-infected cells. *J Biol Chem.* **2003**;278(20):18524-31. doi: 10.1074/jbc.M210723200.
345. **White AR, Hawke SH.** Immunotherapy as a therapeutic treatment for neurodegenerative disorders. *J Neurochem.* **2003**;87(4):801-8. doi: 2064 [pii].
346. **Pankiewicz JE, Sanchez S, Kirshenbaum K, Kacsak RB, Kacsak RJ, Sadowski MJ.** Anti-prion Protein Antibody 6D11 Restores Cellular Proteostasis of Prion Protein Through Disrupting Recycling Propagation of PrP(Sc) and Targeting PrP(Sc) for Lysosomal Degradation. *Mol Neurobiol.* **2018**. doi: 10.1007/s12035-018-1208-4.
347. **Antonyuk SV, Trevitt CR, Strange RW, Jackson GS, Sangar D, Batchelor M, et al.** Crystal structure of human prion protein bound to a therapeutic antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2009**;106(8):2554-8. doi: 10.1073/pnas.0809170106.

348. **Dyer C.** British man with CJD gets experimental treatment in world first. *BMJ*. **2018**;363:k4608. doi: 10.1136/bmj.k4608.
349. **Killworth H.** Pioneering treatment to be given to CJD patient for the first time. London's Global University - Medical Research Council Prion Unit. **2018**. Available from: <https://www.ucl.ac.uk/news/2019/oct/sixth-patient-receives-pioneering-treatment-cjd>.
350. **Reimann RR, Sonati T, Hornemann S, Herrmann US, Arand M, Hawke S, et al.** Differential Toxicity of Antibodies to the Prion Protein. *PLoS Pathog*. **2016**;12(1):e1005401. doi: 10.1371/journal.ppat.1005401.
351. **Klohn PC, Farmer M, Linehan JM, O'Malley C, Fernandez de Marco M, Taylor W, et al.** PrP antibodies do not trigger mouse hippocampal neuron apoptosis. *Science*. **2012**;335(6064):52. doi: 10.1126/science.1215579.
352. **White MD, Farmer M, Mirabile I, Brandner S, Collinge J, Mallucci GR.** Single treatment with RNAi against prion protein rescues early neuronal dysfunction and prolongs survival in mice with prion disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2008**;105(29):10238-43. doi: 10.1073/pnas.0802759105.
353. **Pfeifer A, Eigenbrod S, Al-Khadra S, Hofmann A, Mitteregger G, Moser M, et al.** Lentivector-mediated RNAi efficiently suppresses prion protein and prolongs survival of scrapie-infected mice. *J Clin Invest*. **2006**;116(12):3204-10. doi: 10.1172/JCI29236.
354. **Raymond GJ, Zhao HT, Race B, Raymond LD, Williams K, Swayze EE, et al.** Antisense oligonucleotides extend survival of prion-infected mice. *JCI Insight*. **2019**;5. doi: 10.1172/jci.insight.131175.
355. **Reidenbach AG, Minikel EV, Zhao HT, Guzman SG, Leed AJ, Mesleh MF, et al.** Characterization of the Prion Protein Binding Properties of Antisense Oligonucleotides. *Biomolecules*. **2019**;10(1). doi: 10.3390/biom10010001.
356. **Bueler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, et al.** Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature*. **1992**;356(6370):577-82. doi: 10.1038/356577a0.
357. **Muth C, Schrock K, Madore C, Hartmann K, Fanek Z, Butovsky O, et al.** Activation of microglia by retroviral infection correlates with transient clearance of prions from the brain but does not change incubation time. *Brain Pathol*. **2017**;27(5):590-602. doi: 10.1111/bpa.12441.
358. **Ertmer A, Gilch S, Yun SW, Flechsig E, Klebl B, Stein-Gerlach M, et al.** The tyrosine kinase inhibitor STI571 induces cellular clearance of PrP^{Sc} in prion-infected cells. *J Biol Chem*. **2004**;279(40):41918-27. doi: 10.1074/jbc.M405652200.
359. **Heiseke A, Aguib Y, Riemer C, Baier M, Schatzl HM.** Lithium induces clearance of protease resistant prion protein in prion-infected cells by induction of autophagy. *J Neurochem*. **2009**;109(1):25-34. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.05906.x.
360. **Cortes CJ, Qin K, Cook J, Solanki A, Mastrianni JA.** Rapamycin delays disease onset and prevents PrP plaque deposition in a mouse model of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. *J Neurosci*. **2012**;32(36):12396-405. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6189-11.2012.
361. **Karapetyan YE, Sferrazza GF, Zhou M, Ottenberg G, Spicer T, Chase P, et al.** Unique drug screening approach for prion diseases identifies tacrolimus and astemizole as anti-prion agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2013**;110(17):7044-9. doi: 10.1073/pnas.1303510110.
362. **Axten JM, Medina JR, Feng Y, Shu A, Romeril SP, Grant SW, et al.** Discovery of 7-methyl-5-(1-[[3-(trifluoromethyl)phenyl]acetyl]-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amine (GSK2606414), a potent and selective first-in-class inhibitor of protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase (PERK). *J Med Chem*. **2012**;55(16):7193-207. doi: 10.1021/jm300713s.
363. **Moreno JA, Radford H, Peretti D, Steinert JR, Verity N, Martin MG, et al.** Sustained translational repression by eIF2 α -P mediates prion neurodegeneration. *Nature*. **2012**;485(7399):507-11. doi: 10.1038/nature11058.
364. **Atkin JD, Farg MA, Walker AK, McLean C, Tomas D, Horne MK.** Endoplasmic reticulum stress and induction of the unfolded protein response in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*. **2008**;30(3):400-7. doi: 10.1016/j.nbd.2008.02.009.

365. **Abisambra JF, Jinwal UK, Blair LJ, O'Leary JC, 3rd, Li Q, Brady S, et al.** Tau accumulation activates the unfolded protein response by impairing endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Neurosci.* **2013**;33(22):9498-507. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5397-12.2013.
366. **Kohler C, Dinekov M, Gotz J.** Granulovacuolar degeneration and unfolded protein response in mouse models of tauopathy and Abeta amyloidosis. *Neurobiol Dis.* **2014**;71:169-79. doi: 10.1016/j.nbd.2014.07.006.
367. **Moreno J, Halliday M, Molloy C, Radford H, Verity N, Axten JM, et al.** Oral Treatment Targeting the Unfolded Protein Response Prevents Neurodegeneration and Clinical Disease in Prion-Infected Mice. *Sci Transl Med.* **2013**;5. doi: 10.1126/scitranslmed.3006767.
368. **Forloni G, Artuso V, Roiter I, Morbin M, Tagliavini F.** Therapy in Prion Diseases. *Current Topics in Medicinal Chemistry.* **2013**;13(19):2465-76. doi: 10.2174/15680266113136660173
369. **Forloni G, Roiter I, Tagliavini F.** Clinical trials of prion disease therapeutics. *Curr Opin Pharmacol.* **2019**;44:53-60. doi: 10.1016/j.coph.2019.04.019.
370. **Collinge J, Gorham M, Hudson F, Kennedy A, Keogh G, Pal S, et al.** Safety and efficacy of quinacrine in human prion disease (PRION-1 study): a patient-preference trial. *Lancet Neurol.* **2009**;8(4):334-44. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70049-3.
371. **Geschwind MD, Kuo AL, Wong KS, Haman A, Devereux G, Raudabaugh BJ, et al.** Quinacrine treatment trial for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology.* **2013**;81(23):2015-23. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182a9f3b4.
372. **Bone I, Belton L, Walker AS, Darbyshire J.** Intraventricular pentosan polysulphate in human prion diseases: an observational study in the UK. *Eur J Neurol.* **2008**;15(5):458-64. doi: 10.1111/j.1468-1331.2008.02108.x.
373. **Newman PK, Todd NV, Scoones D, Mead S, Knight RS, Will RG, et al.** Postmortem findings in a case of variant Creutzfeldt-Jakob disease treated with intraventricular pentosan polysulfate. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* **2014**;85(8):921-4. doi: 10.1136/jnnp-2013-305590.
374. **Tsuboi Y, Doh-Ura K, Yamada T.** Continuous intraventricular infusion of pentosan polysulfate: clinical trial against prion diseases. *Neuropathology.* **2009**;29(5):632-6. doi:10.1111/j.1440-1789.2009.01058.x.
375. **Forloni G, Tettamanti M, Lucca U, Albanese Y, Quaglio E, Chiesa R, et al.** Preventive study in subjects at risk of fatal familial insomnia: Innovative approach to rare diseases. *Prion.* **2015**;9(2):75-9. doi: 10.1080/19336896.2015.1027857.
376. **Forloni G, Salmona M, Marcon G, Tagliavini F.** Tetracyclines and prion infectivity. *Infect Disord Drug Targets.* **2009**;9(1):23-30.
377. **Haik S, Marcon G, Mallet A, Tettamanti M, Welaratne A, Giaccone G, et al.** Doxycycline in Creutzfeldt-Jakob disease: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Neurology.* **2014**;13(2):150-8. doi: 10.1016/s1474-4422(13)70307-7.
378. **Varges D, Manthey H, Heinemann U, Ponto C, Schmitz M, Schulz-Schaeffer WJ, et al.** Doxycycline in early CJD: a double-blinded randomised phase II and observational study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* **2017**;88(2):119-25. doi: 10.1136/jnnp-2016-313541.
379. **Sim VL.** Prion disease: chemotherapeutic strategies. *Infect Disord Drug Targets.* **2012**;12(2):144-60. doi: IDDT-EPUP-20120314-001.
380. **Ghaemmaghami S, Ahn M, Lessard P, Giles K, Legname G, DeArmond SJ, et al.** Continuous quinacrine treatment results in the formation of drug-resistant prions. *PLoS Pathog.* **2009**;5(11):e1000673. doi: 10.1371/journal.ppat.1000673.
381. **Giles K, Berry DB, Condello C, Hawley RC, Gallardo-Godoy A, Bryant C, et al.** Different 2-Aminothiazole Therapeutics Produce Distinct Patterns of Scrapie Prion Neuropathology in Mouse Brains. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics.* **2015**;355(1):2-12. doi: 10.1124/jpet.115.224659.
382. **Herrmann US, Schütz AK, Shirani H, Huang D, Saban D, Nuvolone M, et al.** Structure-based drug design identifies polythiophenes as antiprion compounds. *Sci Transl Med.* **2015**;7(299). doi: 10.1126/scitranslmed.aab1923.

383. **Sigurdson CJ, Nilsson KP, Hornemann S, Manco G, Polymenidou M, Schwarz P, et al.** Prion strain discrimination using luminescent conjugated polymers. *Nat Methods*. **2007**;4(12):1023-30. doi: 10.1038/nmeth1131.
384. **Nicoll AJ, Collinge J.** Preventing prion pathogenicity by targeting the cellular prion protein. *Infect Disord Drug Targets*. **2009**;9(1):48-57.
385. **Barreca ML, Iraci N, Biggi S, Cecchetti V, Biasini E.** Pharmacological Agents Targeting the Cellular Prion Protein. *Pathogens*. **2018**;7(1). doi: 10.3390/pathogens7010027.
386. **Priola SA, Raines A, Caughey WS.** Porphyrin and phthalocyanine antiscrapie compounds. *Science*. **2000**;287(5457):1503-6. doi: 8296.
387. **Inoue H, Nojima H, Okayama H.** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. **1990**;96(1):23-8.
388. **Hagihara Y, Aimoto S, Fink AL, Goto Y.** Guanidine Hydrochloride-Induced Folding of Proteins *Journal of Molecular Biology*. **1993**;231(2):180-4. doi: 10.1006/jmbi.1993.1272
389. **Breydo L, Makarava N, Baskakov IV.** Methods for conversion of prion protein into amyloid fibrils. *Methods Mol Biol*. **2008**;459:105-15. doi: 10.1007/978-1-59745-234-2_8.
390. **Vagenende V, Yap MG, Trout BL.** Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol. *Biochemistry*. **2009**;48(46):11084-96. doi: 10.1021/bi900649t.
391. **Torrent J, Martin D, Noinville S, Yin Y, Doumic M, Moudjou M, et al.** Pressure Reveals Unique Conformational Features in Prion Protein Fibril Diversity. *Sci Rep*. **2019**;9(1):2802. doi: 10.1038/s41598-019-39261-8.
392. **Vilotte JL, Soulier S, Essalmani R, Stinnakre MG, Vaiman D, Lepourry L, et al.** Markedly increased susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice expressing ovine prp. *J Virol*. **2001**;75(13):5977-84. doi: 10.1128/JVI.75.13.5977-5984.2001.
393. **Yuan J, Zhan YA, Abskharon R, Xiao X, Martinez MC, Zhou X, et al.** Recombinant human prion protein inhibits prion propagation *in vitro*. *Sci Rep*. **2013**;3:2911. doi: 10.1038/srep02911.
394. **Harrathi C, Fernandez-Borges N, Erana H, Elezgarai SR, Venegas V, Charco JM, et al.** Insights into the Bidirectional Properties of the Sheep-Deer Prion Transmission Barrier. *Mol Neurobiol*. **2018**. doi: 10.1007/s12035-018-1443-8.
395. **Harrathi C.** Estudio de la susceptibilidad/resistencia del ganado ovino a la infección por priones utilizando modelos de propagación *in vitro*. : Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibersitatea; **2015**.
396. **Haldiman T, Kim C, Cohen Y, Chen W, Blevins J, Qing L, et al.** Co-existence of distinct prion types enables conformational evolution of human PrP^{Sc} by competitive selection. *J Biol Chem*. **2013**;288(41):29846-61. doi: 10.1074/jbc.M113.500108.
397. **Peretz D, Williamson RA, Kaneko K, Vergara J, Leclerc E, Schmitt-Ulms G, et al.** Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature*. **2001**;412(6848):739-43. doi: 10.1038/35089090.
398. **Yuan Q, Telling G, Bartelt-Hunt SL, Bartz JC.** Dehydration of Prions on Environmentally Relevant Surfaces Protects Them from Inactivation by Freezing and Thawing. *J Virol*. **2018**;92(8). doi: 10.1128/JVI.02191-17.
399. **Jackson GS, Hosszu LL, Power A, Hill AF, Kenney J, Saibil H, et al.** Reversible conversion of monomeric human prion protein between native and fibrilogenic conformations. *Science*. **1999**;283(5409):1935-7.
400. **Coleman BM, Nisbet RM, Han S, Cappai R, Hatters DM, Hill AF.** Conformational detection of prion protein with biarsenical labeling and FAsH fluorescence. *Biochem Biophys Res Commun*. **2009**;380(3):564-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.01.120.
401. **Arakawa T, Prestrelski SJ, Kenney WC, Carpenter JF.** Factors Affecting Short-Term and Long-Term Stabilities of Proteins *Advanced drug delivery reviews*. **2001**;46(1-3):307-26. doi: 10.1016/s0169-409x(00)00144-7
402. **Cao E, Chen Y, Cui Z, Foster PR.** Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions. *Biotechnol Bioeng*. **2003**;82(6):684-90. doi: 10.1002/bit.10612.
403. **Macritchie F.** Proteins at Interfaces. **1978**;32:283-326. doi: 10.1016/s0065-3233(08)60577-x.

404. **Suelter CH, DeLuca M.** How to Prevent Losses of Protein by Adsorption to Glass and Plastic Analytical biochemistry. **1983**;135(1):112-9. doi: 10.1016/0003-2697(83)90738-8
405. **Erana H, Fernandez-Borges N, Elezgarai SR, Harrathi C, Charco JM, Chianini F, et al.** In Vitro Approach To Identify Key Amino Acids in Low Susceptibility of Rabbit Prion Protein to Misfolding. *J Virol.* **2017**;91(24). doi: 10.1128/JVI.01543-17.
406. **Leffers KW, Wille H, Stohr J, Junger E, Prusiner SB, Riesner D.** Assembly of natural and recombinant prion protein into fibrils. *Biol Chem.* **2005**;386(6):569-80. doi: 10.1515/BC.2005.067.
407. **Xue C, Lin TY, Chang D, Guo Z.** Thioflavin T as an amyloid dye: fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation. *R Soc Open Sci.* **2017**;4(1):160696. doi: 10.1098/rsos.160696.
408. **Nonno R, Di Bari MA, Cardone F, Vaccari G, Fazzi P, Dell'Omo G, et al.** Efficient transmission and characterization of Creutzfeldt-Jakob disease strains in bank voles. *PLoS Pathog.* **2006**;2(2):e12. doi: 10.1371/journal.ppat.0020012.
409. **Pirisinu L, Marcon S, Di Bari MA, D'Agostino C, Agrimi U, Nonno R.** Biochemical characterization of prion strains in bank voles. *Pathogens.* **2013**;2(3):446-56. doi: 10.3390/pathogens2030446.
410. **Watts JC, Giles K, Patel S, Oehler A, DeArmond SJ, Prusiner SB.** Evidence that bank vole PrP is a universal acceptor for prions. *PLoS Pathog.* **2014**;10(4):e1003990. doi: 10.1371/journal.ppat.1003990.
411. **Orru CD, Groveman BR, Raymond LD, Hughson AG, Nonno R, Zou W, et al.** Bank Vole Prion Protein As an Apparently Universal Substrate for RT-QuIC-Based Detection and Discrimination of Prion Strains. *PLoS Pathog.* **2015**;11(6):e1004983. doi: 10.1371/journal.ppat.1004983.
412. **Pirisinu L, Di Bari MA, D'Agostino C, Marcon S, Riccardi G, Poleggi A, et al.** Gerstmann-Straussler-Scheinker disease subtypes efficiently transmit in bank voles as genuine prion diseases. *Sci Rep.* **2016**;6:20443. doi: 10.1038/srep20443.
413. **Edgeworth JA, Jackson GS, Clarke AR, Weissmann C, Collinge J.** Highly sensitive, quantitative cell-based assay for prions adsorbed to solid surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2009**;106(9):3479-83. doi: 10.1073/pnas.0813342106.
414. **Belondrade M, Nicot S, Beringue V, Coste J, Lehmann S, Bougard D.** Rapid and Highly Sensitive Detection of Variant Creutzfeldt-Jakob Disease Abnormal Prion Protein on Steel Surfaces by Protein Misfolding Cyclic Amplification: Application to Prion Decontamination Studies. *PLoS One.* **2016**;11(1):e0146833. doi: 10.1371/journal.pone.0146833.
415. **Mori T, Atarashi R, Furukawa K, Takatsuki H, Satoh K, Sano K, et al.** A direct assessment of human prion adhered to steel wire using real-time quaking-induced conversion. *Sci Rep.* **2016**;6:24993. doi: 10.1038/srep24993.
416. **Kawasaki Y, Kawagoe K, Chen CJ, Teruya K, Sakasegawa Y, Doh-ura K.** Orally administered amyloidophilic compound is effective in prolonging the incubation periods of animals cerebrally infected with prion diseases in a prion strain-dependent manner. *J Virol.* **2007**;81(23):12889-98. doi: 10.1128/JVI.01563-07.
417. **Legname G, Nguyen HO, Peretz D, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB.** Continuum of prion protein structures enciphers a multitude of prion isolate-specified phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2006**;103(50):19105-10. doi: 10.1073/pnas.0608970103.
418. **Gonzalez-Montalban N, Lee YJ, Makarava N, Savtchenko R, Baskakov IV.** Changes in prion replication environment cause prion strain mutation. *FASEB J.* **2013**;27(9):3702-10. doi: 10.1096/fj.13-230466.
419. **Bistaffa E, Moda F, Virgilio T, Campagnani I, De Luca CMG, Rossi M, et al.** Synthetic Prion Selection and Adaptation. *Mol Neurobiol.* **2019**;56(4):2978-89. doi: 10.1007/s12035-018-1279-2.
420. **Igel-Egalon A, Laferriere F, Tixador P, Moudjou M, Herzog L, Reine F, et al.** Crossing Species Barriers Relies on Structurally Distinct Prion Assemblies and Their Complementation. *Mol Neurobiol.* **2020**;57(6):2572-87. doi: 10.1007/s12035-020-01897-3.
421. **Berry DB, Lu D, Geva M, Watts JC, Bhardwaj S, Oehler A, et al.** Drug resistance confounding prion therapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2013**;110(44). doi: 10.1073/pnas.1317164110.

422. **Burke CM, Mark KMK, Kun J, Beauchemin KS, Supattapone S.** Emergence of prions selectively resistant to combination drug therapy. *PLoS Pathog.* **2020**;16(5):e1008581. doi: 10.1371/journal.ppat.1008581.
423. **Bian J, Kang HE, Telling GC.** Quinacrine promotes replication and conformational mutation of chronic wasting disease prions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2014**;111(16):6028-33. doi: 10.1073/pnas.1322377111.
424. **Korth C, May BC, Cohen FE, Prusiner SB.** Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2001**;98(17):9836-41. doi: 10.1073/pnas.161274798.
425. **Haik S, Brandel JP, Salomon D, Sazdovitch V, Delasnerie-Laupretre N, Laplanche JL, et al.** Compassionate use of quinacrine in Creutzfeldt-Jakob disease fails to show significant effects. *Neurology.* **2004**;63(12):2413-5. doi: 63/12/2413.
426. **Giles K, Woerman AL, Berry DB, Prusiner SB.** Bioassays and Inactivation of Prions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2017**;9(8). doi: 10.1101/cshperspect.a023499.
427. **Asante EA, Linehan JM, Smidak M, Tomlinson A, Grimshaw A, Jeelani A, et al.** Inherited prion disease A117V is not simply a proteinopathy but produces prions transmissible to transgenic mice expressing homologous prion protein. *PLoS Pathog.* **2013**;9(9):e1003643. doi: 10.1371/journal.ppat.1003643.
428. **Moda F, Bolognesi ML, Legname G.** Novel screening approaches for human prion diseases drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.* **2019**;14(10):983-93. doi: 10.1080/17460441.2019.1637851.
429. **Jones M, Peden AH, Prowse CV, Groner A, Manson JC, Turner ML, et al.** In vitro amplification and detection of variant Creutzfeldt-Jakob disease PrP^{Sc}. *J Pathol.* **2007**;213(1):21-6. doi: 10.1002/path.2204.
430. **Zerr I, Parchi P.** Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Handb Clin Neurol.* **2018**;153:155-74. doi: 10.1016/B978-0-444-63945-5.00009-X.
431. **Deleault NR, Walsh DJ, Piro JR, Wang F, Wang X, Ma J, et al.** Cofactor molecules maintain infectious conformation and restrict strain properties in purified prions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2012**;109(28):E1938-46. doi: 10.1073/pnas.1206999109.
432. **Barria MA, Mukherjee A, Gonzalez-Romero D, Morales R, Soto C.** De novo generation of infectious prions in vitro produces a new disease phenotype. *PLoS Pathog.* **2009**;5(5):e1000421. doi: 10.1371/journal.ppat.1000421.
433. Fernández-Borges N, Erana H, Elezgarai SR, Harrathi C, Venegas V, Castilla J. A quick method to evaluate the effect of the amino acid sequence in the misfolding proneness of the prion protein. In: Lawson VA, editor. *Prions: Methods and Protocols*: Springer; 2017.
434. **Diack AB, Alibhai JD, Manson JC.** Gene Targeted Transgenic Mouse Models in Prion Research. *Prog Mol Biol Transl Sci.* **2017**;150:157-79. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.06.008.
435. **Chen X, Bhandari B, Zhou P.** Insight into the effect of glycerol on stability of globular proteins in high protein model system. *Food Chem.* **2019**;278:780-5. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.11.117.
436. **Morales R, Moreno-González I, Soto C.** Cross-Seeding of Misfolded Proteins: Implications for Etiology and Pathogenesis of Protein Misfolding Diseases. *PLoS Pathog.* **2013**;9(9). doi: 10.1371/journal.ppat.1003537.g001.
437. **Fernandez-Borges N, Castilla J.** PMCA. A Decade of In Vitro Prion Replication. *Current Chemical Biology.* **2010**;4(3):200-7. doi: 10.2174/187231310792062693.
438. **Gonzalez-Montalban N, Makarava N, Ostapchenko VG, Savtchenk R, Alexeeva I, Rohwer RG, et al.** Highly efficient protein misfolding cyclic amplification. *PLoS Pathog.* **2011**;7(2):e1001277. doi: 10.1371/journal.ppat.1001277.
439. **Johnson CJ, Aiken JM, McKenzie D, Samuel MD, Pedersen JA.** Highly efficient amplification of chronic wasting disease agent by protein misfolding cyclic amplification with beads (PMCAb). *PLoS One.* **2012**;7(4):e35383. doi: 10.1371/journal.pone.0035383.
440. **Groveman BR, Kraus A, Raymond LD, Dolan MA, Anson KJ, Dorward DW, et al.** Charge neutralization of the central lysine cluster in prion protein (PrP) promotes PrP(Sc)-like folding of recombinant PrP amyloids. *J Biol Chem.* **2015**;290(2):1119-28. doi: 10.1074/jbc.M114.619627.

441. **Alred EJ, Lodangco I, Gallaher J, Hansmann UHE.** Mutations Alter RNA-Mediated Conversion of Human Prions. *ACS Omega*. **2018**;3(4):3936-44. doi: 10.1021/acsomega.7b02007.
442. **Kovalchuk Ben-Zaken O, Nissan I, Tzaban S, Taraboulos A, Zcharia E, Matzger S, et al.** Transgenic over-expression of mammalian heparanase delays prion disease onset and progression. *Biochem Biophys Res Commun*. **2015**;464(3):698-704. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.170.
443. **Sevillano AM, Aguilar-Calvo P, Kurt TD, Lawrence JA, Soldau K, Nam TH, et al.** Prion protein glycans reduce intracerebral fibril formation and spongiosis in prion disease. *J Clin Invest*. **2020**;130(3):1350-62. doi: 10.1172/JCI131564.
444. **Makarava N, Kovacs GG, Savtchenko R, Alexeeva I, Budka H, Rohwer RG, et al.** Genesis of mammalian prions: from non-infectious amyloid fibrils to a transmissible prion disease. *PLoS Pathog*. **2011**;7(12):e1002419. doi: 10.1371/journal.ppat.1002419.
445. **Baskakov IV.** The many shades of prion strain adaptation. *Prion*. **2014**;8(2). doi: 10.4161/pri.27836.
446. **Fernandez-Borges N, Erana H, Castilla J.** Behind the potential evolution towards prion resistant species. *Prion*. **2018**;12(2):83-7. doi: 10.1080/19336896.2018.1435935.
447. **Kim C, Xiao X, Chen S, Haldiman T, Smirnovas V, Kofskey D, et al.** Artificial strain of human prions created in vitro. *Nat Commun*. **2018**;9(1):2166. doi: 10.1038/s41467-018-04584-z.
448. **Cosseddu GM, Nonno R, Vaccari G, Bucalossi C, Fernandez-Borges N, Di Bari MA, et al.** Ultra-efficient PrP(Sc) amplification highlights potentialities and pitfalls of PMCA technology. *PLoS Pathog*. **2011**;7(11):e1002370. doi: 10.1371/journal.ppat.1002370.
449. **Redaelli V, Bistaffa E, Zanusso G, Salzano G, Sacchetto L, Rossi M, et al.** Detection of prion seeding activity in the olfactory mucosa of patients with Fatal Familial Insomnia. *Sci Rep*. **2017**;7:46269. doi: 10.1038/srep46269.
450. **Nonno R, Notari S, Di Bari MA, Cali I, Pirisinu L, d'Agostino C, et al.** Variable Protease-Sensitive Prionopathy Transmission to Bank Voles. *Emerg Infect Dis*. **2019**;25(1):73-81. doi: 10.3201/eid2501.180807.
451. **Di Bari MA, Chianini F, Vaccari G, Esposito E, Conte M, Eaton SL, et al.** The bank vole (*Myodes glareolus*) as a sensitive bioassay for sheep scrapie. *J Gen Virol*. **2008**;89(Pt 12):2975-85. doi: 10.1099/vir.0.2008/005520-0.
452. **Di Bari MA, Nonno R, Castilla J, D'Agostino C, Pirisinu L, Riccardi G, et al.** Chronic wasting disease in bank voles: characterisation of the shortest incubation time model for prion diseases. *PLoS Pathog*. **2013**;9(3):e1003219. doi: 10.1371/journal.ppat.1003219.
453. **Otero A, Hedman C, Fernandez-Borges N, Erana H, Marin B, Monzon M, et al.** A Single Amino Acid Substitution, Found in Mammals with Low Susceptibility to Prion Diseases, Delays Propagation of Two Prion Strains in Highly Susceptible Transgenic Mouse Models. *Mol Neurobiol*. **2019**. doi: 10.1007/s12035-019-1535-0.
454. **Forloni G, Iussich S, Awan T, Colombo L, Angeretti N, Girola L, et al.** Tetracyclines affect prion infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2002**;99(16):10849-54. doi: 10.1073/pnas.162195499.
455. **Zaccagnini L, Rossetti G, Tran TH, Salzano G, Gandini A, Colini Baldeschi A, et al.** In silico/in vitro screening and hit evaluation identified new phenothiazine anti-prion derivatives. *Eur J Med Chem*. **2020**;196:112295. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112295.
456. **Richt JA, Kasinathan P, Hamir AN, Castilla J, Sathiyaseelan T, Vargas F, et al.** Production of cattle lacking prion protein. *Nat Biotechnol*. **2007**;25(1):132-8. doi: 10.1038/nbt1271.
457. **Benestad SL, Austbo L, Tranulis MA, Espenes A, Olsaker I.** Healthy goats naturally devoid of prion protein. *Vet Res*. **2012**;43(1):87. doi: 10.1186/1297-9716-43-87.
458. **Kocisko DA, Caughey B.** Searching for anti-prion compounds: cell-based high-throughput in vitro assays and animal testing strategies. *Methods Enzymol*. **2006**;412:223-34. doi:10.1016/S0076-6879(06)12014-5.
459. **Bach S, Talarek N, Andrieu T, Vierfond JM, Mettey Y, Galons H, et al.** Isolation of drugs active against mammalian prions using a yeast-based screening assay. *Nat Biotechnol*. **2003**;21(9):1075-81. doi: 10.1038/nbt855.

460. **Kawatake S, Nishimura Y, Sakaguchi S, Iwaki T, Doh-ura K.** Surface plasmon resonance analysis for the screening of anti-prion compounds. *Biol Pharm Bull.* **2006**;29(5):927-32. doi: JST.JSTAGE/bpb/29.927 [pii].
461. **Bertsch U, Winklhofer KF, Hirschberger T, Bieschke J, Weber P, Hartl FU, et al.** Systematic identification of antiprion drugs by high-throughput screening based on scanning for intensely fluorescent targets. *J Virol.* **2005**;79(12):7785-91. doi: 10.1128/JVI.79.12.7785-7791.2005.
462. **Kocisko DA, Bertholet N, Moore RA, Caughey B, Vaillant A.** Identification of prion inhibitors by a fluorescence-polarization-based competitive binding assay. *Anal Biochem.* **2007**;363(1):154-6. doi:10.1016/j.ab.2006.11.007.
463. **Ma B, Yamaguchi K, Fukuoka M, Kuwata K.** Logical design of anti-prion agents using NAGARA. *Biochem Biophys Res Commun.* **2016**;469(4):930-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.12.106.
464. **Rigoli M, Spagnoli G, Faccioli P, Requena JR, Biasini E.** Ok Google, how could I design therapeutics against prion diseases? *Curr Opin Pharmacol.* **2019**;44:39-45. doi: 10.1016/j.coph.2019.03.015.
465. **Zobeley E, Flechsig E, Cozzio A, Enari M, Weissmann C.** Infectivity of scrapie prions bound to a stainless steel surface. *Mol Med.* **1999**;5(4):240-3.
466. **Flechsig E, Hegyi I, Enari M, Schwarz P, Collinge J, Weissmann C.** Transmission of scrapie by steel-surface-bound prions. *Mol Med.* **2001**;7(10):679-84. doi: S1528365801006796 [pii].
467. **Weissmann C, Enari M, Klohn PC, Rossi D, Flechsig E.** Transmission of prions. *J Infect Dis.* **2002**;186 Suppl 2:S157-65. doi: 10.1086/344575.
468. **Lemmer K, Mielke M, Pauli G, Beekes M.** Decontamination of surgical instruments from prion proteins: in vitro studies on the detachment, destabilization and degradation of PrPSc bound to steel surfaces. *J Gen Virol.* **2004**;85(Pt 12):3805-16. doi:10.1099/vir.0.80346-0.
469. **Edgeworth JA, Sicilia A, Linehan J, Brandner S, Jackson GS, Collinge J.** A standardized comparison of commercially available prion decontamination reagents using the Standard Steel-Binding Assay. *J Gen Virol.* **2011**;92(Pt 3):718-26. doi: 10.1099/vir.0.027201-0.
470. **Hughson AG, Race B, Kraus A, Sangare LR, Robins L, Groveman BR, et al.** Inactivation of Prions and Amyloid Seeds with Hypochlorous Acid. *PLoS Pathog.* **2016**;12(9):e1005914. doi: 10.1371/journal.ppat.1005914.
471. **Brown P, Farrell M.** A practical approach to avoiding iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) from invasive instruments. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **2015**;36(7):844-8. doi: 10.1017/ice.2015.53.